YÜKSEK VERİMLİ SELÜLAZ ÜRETEN BİR MUTANT SUŞ GELİŞTİRMEK İÇİN ETİL METAN SÜLFONAT (EMS) YOLUYLA *BACILLUS SUBTILIS* 171ES MUTAJENEZİ VE MUTANT ENZİM KARAKTERİZASYONU

İrem YILDIRIM

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK VERİMLİ SELÜLAZ ÜRETEN BİR MUTANT SUŞ GELİŞTİRMEK İÇİN ETİL METAN SÜLFONAT (EMS) YOLUYLA *BACILLUS SUBTILIS* 171ES MUTAJENEZİ VE MUTANT ENZİM KARAKTERİZASYONU

İrem YILDIRIM
0009-0001-0979-5810

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YÜKSEK VERİMLİ SELÜLAZ ÜRETEN BİR MUTANT SUŞ GELİŞTİRMEK İÇİN ETİL METAN SÜLFONAT (EMS) YOLUYLA *BACILLUS SUBTILIS* 171ES MUTAJENEZİ VE MUTANT ENZİM KARAKTERİZASYONU

İrem YILDIRIM

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada, *Bacillus subtilis* ES171 suşu kullanılarak yapılan EMS mutasyon çalışması sonucu olarak toplamda 538 adet mutant suş elde edilmiştir. Bu mutant suşların, uygulanan EMS dozları sonrası koloni ve selülaz hidroliz zonları ölçülerek Eİ değerleri hesaplanmış ve en yüksek Eİ değerleri sırasıyla 3.8 ile IE1, 3.7 ile IE3, 3.5 ile IE4 ve 2.7 ile IE2 mutantları ile elde edilmiştir. Selülaz zon çapları ölçüldüğünde, ana suşa (12 mm) kıyasla IE1 (19 mm), IE2 (19 mm), IE3 (17 mm) ve IE4 (14 mm) daha iyi sonuçlar vererek, ana suşun maksimum aktivite gösterdiği modifiye ortamda mutantların enzim üretim kapasitesi test edilmiştir. Mutant IE3'de ana suşa göre enzim veriminin %82 oranında arttığı, mutant IE1'de %39, mutant IE2'de %11 ve mutant IE4'de %2 oranında artış gösterdiği tespit edilmiştir. 64. Saatte optimum enzim aktivitesi gösteren IE3 mutant enzimi (857 U/mL), ana suşa kıyasla (453 U/mL) yaklaşık olarak 2 kat daha fazla enzim aktivitesi göstermiş, çalışmalara IE3 mutantı ile devam edilmiştir.

Mutant suş IE3'ün enzim özelliklerini belirlemek amacı ile enzim kısmi olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde; amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon basamakları uygulanmıştır. Bu işlem basamakları sonunda enzim %3 verimle 8,1 kez saflaştırılmıştır. Kısmi saf enzimin fiziksel parametrelerde 50°C sıcaklıkta, pH 5.0 değerinde optimum değer gösterdiği tespit edilmiş ve enzimin termostabil olduğu belirlenmiştir. $MnSO_4$, NaCl, KCl metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine aktivatör etki yaptığı saptanmış, V_{max} ve K_m kinetik değerleri 909 U/mL ve 0,01 mM olarak bulunmuştur. Enzimin moleküler ağırlığı 63 kDa olarak saptanıp, depolanma stabilitesinde -20 ºC'de 120 günde yalnızca %15 oranında bir aktivite kaybı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus,* Rastgele Mutasyon, EMS, Selülaz, Kısmi Saflaştırma, Karakterizasyon

2024, xvi+ 88

ABSTRACT

MSc Thesis

MUTAGENESIS BY ETHYL METHANE SULFONATE (EMS) TO DEVELOP A MUTANT STRAIN PRODUCING HIGH-EFFICIENCY CELLULASE FROM *BACILLUS SUBTILIS* 171ES, AND CHARACTERIZATION OF THE MUTANT ENZYME

Irem YILDIRIM

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Supervisor: Elif DEMIRKAN

In this study, a total of 538 mutant strains were obtained using Bacillus subtilis ES171 through EMS mutagenesis. The enzyme index (EI) values of these mutant strains were calculated by measuring their colony and cellulase hydrolysis zones after applying various EMS doses. The highest EI values were achieved with mutants IE1 (3.8), IE3 (3.7), IE4 (3.5), and IE2 (2.7). When measuring cellulase zone diameters, mutants IE1 (19 mm), IE2 (19 mm), IE3 (17 mm), and IE4 (14 mm) showed improved results compared to the parent strain (12 mm). The enzyme production capacity of the mutants was tested in a modified medium where the parent strain exhibited maximum activity. It was found that the enzyme yield in mutant IE3 increased by 82% compared to the parent strain, while mutant IE1 showed a 39% increase, mutant IE2 an 11% increase, and mutant IE4 a 2% increase.

The IE3 mutant enzyme exhibited optimal enzyme activity of 857 U/mL at the 64th hour, which is approximately twice that of the parent strain (453 U/mL). Further studies were conducted using the IE3 mutant. To determine the enzyme characteristics, IE3 was partially purified through ammonium sulfate precipitation, dialysis, and ultrafiltration, resulting in an enzyme that was 8.1 times purified with a 3% yield. The partially purified enzyme exhibited optimal activity at 50°C and pH 5.0, demonstrating thermostability. Metal ions such as MnSO4, NaCl, and KCl activated the enzyme, with kinetic values of V_{max} 909 U/mL and K_m 0.01 mM. The molecular weight of the enzyme was determined to be 63 kDa, and it showed good storage stability, losing only 15% activity over 120 days at -20°C.

Key Words: *Bacillus*, Random Mutation, EMS, Cellulase, Partial Purification, Characterization

2024, xvi + 88

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresinde hem tezim hem de projemizin yürütülmesinde desteğini benden esirgemeyen, tecrübelerini ve bilgilerini benim sabır ve güler yüzle paylaşan, manevi olarak da desteğini çok gördüğüm sevgili danışmanım Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürecimde hem maddi hem manevi desteğini esirgemeyen, daima yanımda olan annem Nalan ATASEVER'e, kardeşim Aslı Naz YILDIRIM'a ve her daim destekçim olup bana güç veren sevgili arkadaşım Mehmet Ali UYGUN'a sonsuz teşekkürler.

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi FGA-2023-1357 kodlu "*Bacillus subtilis* 171ES'den yüksek miktarda selülaz üretimi için Etil Metansülfonat EMS mutagenezi ile suş iyileştirme tekstil endüstrisinde biyotaşlama ve biyoparlatma için mutant selülazın etkinliğinin araştırılması" konulu proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET viii
ABSTRACT viii
TEŞEKKÜR x
İÇİNDEKİLER xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ xv
ÇİZELGELER DİZİNİ xvi
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 4
2.1. Selülazın Tarihçesi 4
2.2. Selüloz 5
2.3. Selülaz 8
2.3.1. Katalitik Alan (CD) ve Selüloz Bağlayıcı Alan (CBD) 10
2.4. Selüloz Parçalanma Mekanizmaları 11
2.4.1. Kompleks Selüloliz 11
2.4.2. Kompleks Olmayan Selüloliz 12
2.5. Sinerjizm 13
2.6. Selülazların Sınıflandırılması 13
2.6.1. Endoselülazlar (EC 3.2.1.4) 14
2.6.2. Ekzoselülazlar (EC 3.2.1.91) 14
2.6.3. β-glukozidazlar 14
2.6.4. Oksidatif Selülazlar 14
2.6.5. Selülaz Fosforilaz 14
2.7. Selülaz Kaynakları 15
2.7.1. Hayvansal Selülazlar 15
2.7.2. Fungal Selülazlar 15
2.7.3. Mikrobiyal Selülazlar 16
2.7.4. Bakteriyel Selülazlar 17
2.7.5. Bitkisel Selülazlar 18
2.8. Endüstriyel Selülazlar 18
2.8.1. Tekstil Endüstrisi 19
2.8.2. Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisi 20
2.8.3. Çamaşır ve Deterjan Endüstrisi 21
2.8.4. Gıda ve Hayvan Yemi Endüstrisi 22
2.8.5. Tarım Endüstrisi 23
2.8.6. Biyoyakıt Endüstrisi 23
2.9. *Bacillus* Cinsinin Genel Özellikleri 24
2.9.1. *Bacillus*'tan Elde Edilen Selülazlar 26
2.10. 3,5-Dinitrosalisilik Asit (DNS) Yöntemi 27
2.11. Mutasyon 29
2.11.1. EMS (Etil metansülfonat) Mutagenezi 32

2.11.2. EMS Mutasyonu Tamir Mekanizması 34
3. MATERYAL VE YÖNTEM 36
3.1. Materyal 36
3.2. Yöntem 36
3.2.1. Kimyasal mutajen EMS (Etil Metansülfonat) ile mutasyon çalışması ve selülaz enziminin kalitatif tayini 36
3.2.2. Mutant bakterilerden selülaz üretim koşulları 37
3.2.3. Bakteri üremesinin ölçülmesi ve enzim aktivitesinin ölçülmesi 38
3.2.4. Glukoz standart eğrisi grafiği ve hazırlanması 40
3.2.5. Selülaz üretimi üzerine bazı tarımsal atıkların etkisi 41
3.2.6. Selülaz enziminin kısmi saflaştırılması 42
3.2.7. Protein miktarının belirlenmesi 43
3.2.8. Selülaz enzimin karakterize edilmesi 44
3.2.9. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi 45
3.2.10. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 45
3.2.11. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi 45
3.2.12. Kinetik parametrelerin saptanması 46
3.2.13. Selülaz enziminin moleküler ağırlığının tespiti 46
3.2.14. Ham enzimin depolanma stabilitesinin saptanması 49
4. BULGULAR 50
4.1. Mutant Bakterilerin Elde Edilmesi ve Enzim Üretiminin Kalitatif Olarak Saptanması 50
4.2. Mutantların Enzim Üretiminin Kantitatif Olarak Saptanması 52
4.3. Enzim üretimi üzerine bazı tarımsal atıkların etkisi 54
4.4. Selülaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması 55
4.5. Kısmi Olarak Saflaştırılan Selülaz Enziminin Karakterizasyonu 56
4.5.1. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin etkisi 56
4.5.2. Enzim aktivitesi üzerine pH ve pH stabilitesinin etkisi 58
4.5.3. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi 61
4.5.4. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonun etkisi 63
4.5.5. Enzimin moleküler ağırlığının tespit edilmesi 64
4.6. Ham Enzimin Depolanma Stabilitesinin Belirlenmesi 66
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 68
KAYNAKLAR 78
ÖZGEÇMİŞ 88

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
A	Adenin
α	Alfa
NH_4Cl	Amonyum Klorür
$(NH_4)_2NO_3$	Amonyum Nitrat
$CuSO_4$	Bakır sülfat
β	Beta
$BaCl_2$	Baryum Klorur
$ZnSO_4$	Çinko sülfat
Dk	Dakika
$FeSO_4$	Demir sülfat
$(NH_4)_2HPO_4$	Diamonyum sülfat
HCl	Gram
G	Guanin
$CaCl_2$	Kalsiyum klorur
CMC	Karboksil metil selüloz
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogram
$LiSO_4$	Lityum sülfat
V_{max}	Maksimum enzim aktivitesi
$MnSO_4$	Manganez (II) sülfat
$MgSO_4$	Magnezyum sülfat
K_m	Michaelis-Menten sabitesi
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µmol	Mikromol
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
KCl	Potasyum klorür
KNO_3	Potasyum Nitrat
R_2	Regresyon Katsayısı
°C	Santigrat Derece
C	Sitozin
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaCl	Sodyum Klorür
$NaNO_3$	Sodyum Nitrat
[S]	Substrat Konsantrasyonu
T	Timin

U	Ünite
%	Yüzde orantı

Kısaltmalar	**Açıklama**
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
APS	Amonyum Per Sülfat
DNA	Deoksiribonukleik Asit
dH2O	Distile Su
EC	Enzim Komisyonu
Eİ	Enzimatik İndeksi
EMS	Etil Metansülfonat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
CMC	Karboksil metil selüloz
MGMT	Metil Guanin MetilTransferaz
MW	Molecular Weight
NB	Nutrient Broth
OD	Optik Dansite (Optik Yoğunluk)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	Revolutions Per Minute
RT	Room Temperature (Oda sıcaklığı)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
BSA	Sığır serum albümini
TEMED	Tetrametilendiamin
sp.	Tür
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Selülozun moleküler yapısı. 7
Şekil 2.2. Selüloz fibrilleri ve moleküler yapısı 8
Şekil 2.3. Selülaz enziminin, selüloz üzerine etki mekanizması 10
Şekil 2.4. *Trichoderma reesei* tarafından selülozun kompleks olmayan hidrolizi.. 13
Şekil 2.5. Artan şeker konsantrasyonunun renk yoğunluğuna etkisi. 28
Şekil 2.6. DNS yönteminin etki mekanizması 28
Şekil 2.7. EMS kimyasal yapısı 32
Şekil 2.8. O6- metilguanin-DNA metiltransferaz molekülünün onarım mekanizması…….. 35
Şekil 4.1. Ana suş olan ES171'in CMC agarlı ortamdaki koloni hidrolitik zon görüntüsü 52
Şekil 4.2. Mutantların CMC agarlı ortamdaki koloni hidrolitik zon görüntüleri… 52
Şekil 4.3. Ana suş ve mutant bakterilerin zamana bağlı selülaz enzim üretimlerinin karşılaştırılması 53
Şekil 4.4. Tarımsal atıkların selülaz aktivitesi ve bakteri üremesi üzerine etkileri 55
Şekil 4.5. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi 57
Şekil 4.6. Sıcaklık stabilitesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi 58
Şekil 4.7. Enzim aktivitesi üzerine pH değerlerinin etkisi 60
Şekil 4.8. Enzim aktivitesi üzerine pH stabilitesinin etkisi 61
Şekil 4.9. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi 63
Şekil 4.10. Enzim aktivitesinin üzerine substrat konsantrasyonu etkisi (Lineweaver- Burk grafiği ve Michaelis- Menten grafiği). 64
Şekil 4.11. Standart proteinlerin Rf değerleri ve molekül ağırlıklarına göre oluşturulan standart eğri 65
Şekil 4.12. SDS-PAGE işleminden sonra elde edilen jelde protein bant görüntüsü 66
Şekil 4.13. Ham enzimin depolanma stabilitesi 67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Mutant bakteriden selülaz enzimi üretimi için kullanılan modifiye besi ortamı. 37
Çizelge 3.2. Selülaz aktivite tayini basamakları 40
Çizelge 3.3. SDS-PAGE yöntemi için hazırlanan jellerin içerikleri. 48
Çizelge 4.1. *Bacillus subtilis* 171ES'nin canlılık ve ölüm oranları üzerine EMS'nin etkisi 51
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan EMS denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve selülaz zon çapları 51
Çizelge 4.3. Ana suş ve bunun mutant suşlarının selülaz üretim kapasitelerinin zamana bağlı karşılaştırılması 53
Çizelge 4.4. Tarımsal atıklarının bakteri üremesi ve selülaz üretimi üzerine etkileri 54
Çizelge 4.5. Selülaz enziminin kısmi saflaştırma basamakları 56
Çizelge 4.6. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi 57
Çizelge 4.7. Sıcaklık stabilitesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi 58
Çizelge 4.8. Enzim aktivitesi üzerine pH değerlerinin etkisi 59
Çizelge 4.9. Enzim aktivitesi üzerine pH stabilitesinin etkisi 59
Çizelge 4.10. Potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkisi 62
Çizelge 4.11. Enzim aktivitesi üzerine substratın etkisi 63
Çizelge 4.12. Ham enzimin depolanma stabilitesi 67

1. GİRİŞ

Enzimler, kimyasal reaksiyonları hızlandırarak biyolojik katalizör görevi gören genellikle amino asit polimerlerinden oluşan proteinlerdir. Hücredeki metabolik süreçler ve diğer kimyasal reaksiyonlar, yaşamın sürdürülmesi için gerekli olan bir dizi enzim tarafından gerçekleştirilir. "Enzim" terimi ilk olarak Alman fizyolog Wilhelm Kühne tarafından 1878 yılında mayanın fermentasyonunda kullanılmıştır. Yunanca en (içeride) ve zume (maya) sözcüklerinin bir araya gelmesi ile türemiştir (Robinson, 2015).

Enzimler istenmeyen herhangi bir yan ürün üretmeden, belli çevre koşullarında substratın kimyasal ve yapısal konfigürasyonuna dayanan bir özgünlüğe sahiptir. Kimyasal olarak gerçekleştirmesi zor olan reaksiyonların enzimlerle kolayca gerçekleştirilebileceği ve hücre içinde aktif görevi olan enzimlerin hücrelerden izole edilerek in vitro ortamda da kullanılabileceği fikrinin doğmasına yol açmıştır. Endüstriyel biyokatalizörler olarak enzimler, sürdürülebilirlik ve süreç verimliliği açısından geleneksel kimyasal süreçlere göre çok sayıda avantaj sunar. Endüstride ise ürünlerin verim ve kalitesini iyileştirip, değerli hammaddelerin tasarrufunu sağlayarak daha az atık oluşumunu mümkün kılmaktadır. Enzimler bu özellikleri sayesinde pek çok çalışma için ilgi çekici hale gelmiş ve rağbet görmüştür (Anbu ve ark. 2013; Singh ve ark. 2016; Mamrajab ve ark. 2023).

Enzimler bakteriler, mantarlar ve mayalar gibi mikrobiyal kaynaklardan veya bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilebilmektedir. Çeşitli endüstriyel uygulamalar için mikrobiyal enzim kaynakları, mikrobiyal olmayan kaynaklara göre üretim maliyetinin nispeten az olması, ham maddelerin kolay temini ve stabilitesi, iyi tanımlanan bir hücresel metabolizma ve hızlı çoğalma özelliklerinden dolayı tercih sebebi olmaktadır. Ayrıca mikrobiyal kaynaklar tarafından üretilen enzimler, karmaşık endüstriyel uygulamaların ihtiyaçlarına göre gen manipülasyonları ile uyarlanarak yüksek verim elde edilebilir (Sharma ve ark. 2019).

Enzimlerin olağanüstü özellikleri biyoteknolojik süreçlerde devrim niteliğinde bir etki yaratmış ve günümüzde yaklaşık 500'ün üzerinde ticari ürünün üretiminde

kullanılmaktadır (Anonim, 2024a). Enzimlerin gıda sanayi, tekstil, deri işlenmesi, hayvan yemi, deterjan endüstrisi, kâğıtların üretimi, biyo-yakıt endüstri ve farmakoloji gibi diğer endüstriyel alanlarda kullanımı olduğu gibi tıp alanında teşhis ve tedavi için de kullanıma sahiptir (Mesbah, 2022).

Endüstride kullanılan başlıca enzimler, amilazlar, proteazlar, lipazlar, selülazlar, ksilanazlar ve katalazlar vb.'dir. Bu enzimler arasında selülazlar tekstil uygulamalarında biyolojik parlatma ve biyolojik taşlamada yaygın olarak kullanılır, lignoselülozik hammaddelerin parçalanmasında güçlü bir yeteneğe sahiptir ve lignoselülozik atıklardan biyoyakıt üretiminde rol oynar. Hayvan yemlerinde, kağıt ve meyve suyu endüstrisinde de kullanım potansiyeli yüksektir (Kumar ve ark. 2014).

Küresel selülaz pazarının, 2024'te tahmini 2162,4 milyon ABD dolarından 2030 yılına kadar 3119,8 milyon ABD dolarına ulaşması ve 2024 ile 2030 yılları arasında %6,3'lük bileşik yıllık büyüme oranına (CAGR) ulaşması öngörülmektedir. Ürün açısından, endoglukanazlar yaklaşık %40'lık bir payla en büyük segmenttir. Uygulama açısından ise en büyük uygulama hayvan yemi, ardından gıda ve içecek, tekstil ve biyoyakıtlar gelir. Avrupa yaklaşık %30'luk payla en büyük pazar konumunda olup, onu %25'in üzerinde payla Asya-Pasifik ve Kuzey Amerika takip etmektedir (Anonim, 2024b).

Ticari olarak kullanılan selülaz *Trichoderma* sp., *Aspergillus*, *Penicillium*, Basidiomycetes ve *Bacillus* suşlarından elde edilmektedir.

Ana bakteriyel suşların enzim performansını iyileştirmek için UV, mikrodalga radyasyon, fiziksel ve kimyasal mutagenez veya bölgeye yönelik mutagenez yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır (Zeng ve ark. 2017). Mutagenez tekniği, spesifik aktivite, optimum pH ve termostabilite gibi özellikleri değiştirme amacıyla veya belli proteinlerin yapı ve işlev ilişkilerini çözümleyebilmek için protein mühendisliği alanında önemli yere sahiptir. Mutagenez tekniğinde, rastgele mutagenez ve rasyonel tasarım olmak üzere iki temel yaklaşım bulunur (Tachioka, 2016). Rastgele mutagenez tekniklerinde, hücreler UV ışını veya bazı kimyasallar gibi mutajenlere maruz bırakılmakta ve sonra istenilen özellikteki

mutantlar saptanmaktadır (Crow ve Abrahamson, 1997). Mutajenik ajanların (Nitröz asit, dimetil sülfonat, X-ışınları, UV-ışınları ve etil metansülfonat (EMS)) temel etkisi, DNA'nın baz dizisinde bir modifikasyon veya lezyon yaratmaya dayanmaktadır.

Etil metansülfonat (EMS) teratojenik, mutajenik ve kanserojen bir ajandır. EMS mutagenezi, gen fonksiyonu analizlerinde 50 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır (Axelrod ve ark. 2015). EMS tek fonksiyonlu bir alkilleyici ajandır, nükleotitlerde kimyasal modifikasyonu indükleyerek baz değişikliklerine ve yanlış eşleşmelere sebep olur. EMS ile yapılan mutasyon çalışmalarında mutant suşun ana suştan 1,4-3 kat aralığı kadar daha fazla enzim üretebildiği bildirilmiştir (Pandey ve ark. 1999). Rastgele mutagenez, enzimler, proteinler, tüm metabolik yollar ve hatta istenen veya geliştirilmiş özelliklere sahip tüm genomlar oluşturmak için güçlü bir yöntemdir. Bu yöntemin endüstriyel önemi olup, enzimleri yüksek verimle üretebilme yeteneğine sahip yeni suş geliştirme nedenleriyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Ruaida ve Karim, 2021).

Bu çalışmada Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarında daha önceden selülaz enzimi üretimi için topraktan izole edilip adlandırılmış olan *Bacillus subtilis* 171ES suşu kullanılarak, kimyasal mutajen Etil Metan Sülfonat (EMS) kullanımı ile verimli mutant suşlar elde edilmiştir. En çok verim gösteren bir mutant suş seçilmiş ve mutanın enzimi kısmi olarak saflaştırılarak özellikleri ortaya çıkarılmıştır (Optimum pH, Sıcaklık, pH ve sıcaklık stabiliteleri, K_m, V_{max}, SDS-PAGE ile moleküler ağırlığı). Ayrıca ham enzimin farklı sıcaklıklarda (oda sıcaklığı, +4°C ve -20°C) depolanma stabilitesi de kontrol edilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Selülazın Tarihçesi

Selülaz enziminin tanımlanması, filamentöz bir mantar olan *Trichoderma reesei*'nin yüksek verimli selülaz ve hemiselülaz enzimi üretme kapasitesinin keşfi ile başlamıştır. *Trichoderma* türleri, dünyanın her tarafında geniş bir yayılım göstererek, özellikle çürüyen ahşap ve toprak dahil olmak üzere birçok farklı doğal habitatta bulunan bir mantar cinsidir (Li ve ark. 2017). Bu mantar türü ilk olarak İkinci Dünya Savaşı sırasında, ABD ordusunun Solomon Adaları'nda bulunan ve çürümekte olan çadır bezlerinden izole edilerek önce *Trichoderma viride* olarak tanımlanmış, daha sonra selülaz üretimi için model organizma olarak kullanılmıştır.

1950 yılında Elwyn T. Reese ve arkadaşları, selülozun parçalanmasında rolü olan bir takım enzim mekanizmaları öne sürmüştür. Bu mekanizmalara göre iki aşama belirlenmiştir ve daha sonra 1952'de Reese ve Levinson tarafından, selülolitik organizmaların etkisi üzerine kapsamlı bir karşılaştırmalı çalışma yapılmış ve daha sonra *Trichoderma viride* suşundan selülaz enzim kompleksini tanımlanmıştır (Mandels ve Reese, 1957). Daha sonra yapılan araştırmalarda, izolatın *Trichoderma viride* türünden farklı olduğu belirtilen suş, araştırmacı Elwyn T. Reese'in onuruna, *Trichoderma reesei* olmak üzere yeniden adlandırılmıştır.

Quartermaster Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nde yapılan bir çalışmada, *Trichoderma* izolatı doğal selülozu parçalamada olağanüstü bir performans göstermiş olup, bilinen *Trichoderma viride* suşundan farklılık gösterdiği anlaşılmıştır. Bunlar üzerine bu orijinal izolat, merkez koleksiyonunda muhafaza edilen altı mantar türünün sonuncusu olduğundan "QM6a" olarak tanımlanmıştır (Paloheimo ve ark. 2016).

T. reesei'nin selülaz kompleksi; karboksimetilselüloz gibi selüloz türevlerine etki eden endoglukanazlar (endo-l,4-/3-D-glukanaz) ve ekzoglukanazlar olan sellobiyohidrolazlar (1,4-/3-D glukansellobiyohidrolaz) ve sellobiyazı kapsar. Fakat kristal selülozu parçalayamadığından sellobiyaz, tam bir selülaz enzimi olarak bahsedilmese de, söz

konusu ürünler glikoz şurubu olduğu öngörülürse komplekste önemli bir bileşendir (Sheir-Neiss ve Montenecourt, 1984).

Trichoderma reesei filtratından izole edilen selülaz enzimi, 1974 yılında Berghem, Pettersson ve Axiö-Fredriksson tarafında karakterize edilmiştir. Çalışmalar sonucu enzimin β-1,4-glukan sellobiohidrolaz olduğunu ve mikrokristalin selülozu 72 saat içinde yaklaşık %80 oranında parçalayabildiğini, reaksiyon hızının ise endo-glukanaz ilavesiyle arttırılabileceğini keşfetmişlerdir. Enzim, proteine %9.2 oranında kovalent olarak bağlı karbohidrat içermekle beraber bu karbohidratlar mannoz, glikoz ve galaktoz olarak tanımlanmıştır (Berghem ve Pettersson, 1974).

Son 70 yılda, orijinal suş olarak bilinen QM6a'dan, çeşitli endüstriyel uygulamalar için yüksek verimli enzim üreticileri (QM9414 ve RUT-C30 gibi) yapay olarak üretilmiştir (Li ve ark. 2017).

2.2. Selüloz

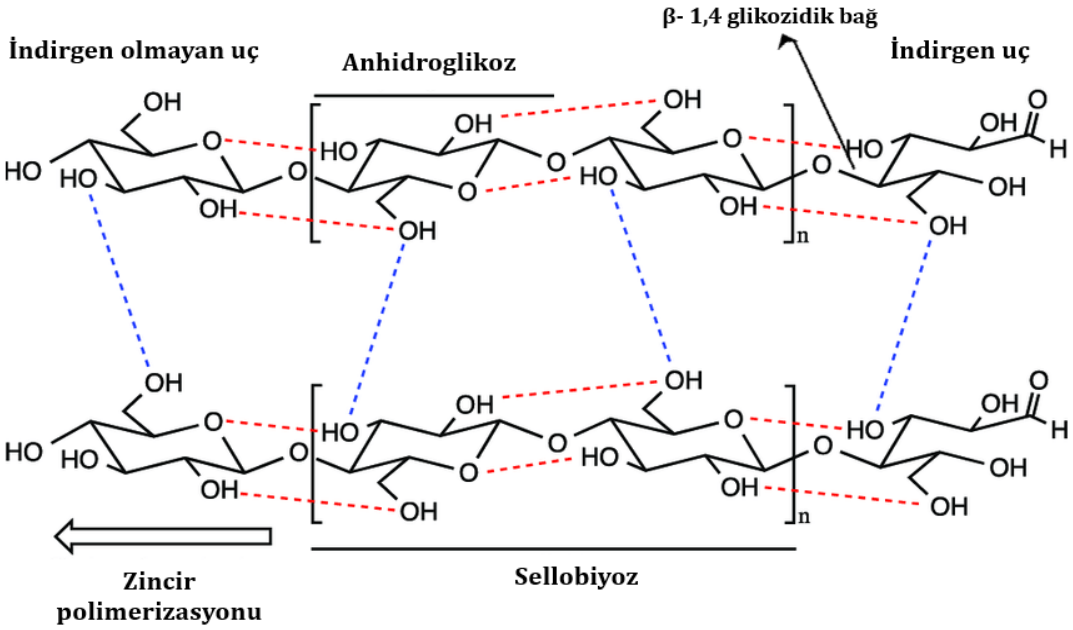
Selüloz, yeryüzünde en çok bulunan organik bileşik olup, yüksek bitkilerin hücre duvarı yapısını oluşturan ana bileşendir (Rudnik, 2012). Saf formda bulunabildiği gibi genellikle ligninler, hemiselülozlar veya az miktarlarda ekstraktif maddeler selülozun yapısına eşlik eder. Selüloz doğada bitkilerle beraber hayvanlarda, mantarlarda veya alglerde de bulunmaktadır. Örneğin pamuk, ağırlıkça %90 ve fazlasını içeren saf bir selüloz kaynağıdır. Bununla birlikte çeşitli yeşil alg türleri (Örn. *Valonia ventricosa, Glaucocystis*), bazı deniz hayvanları (çeşitli *Tunicata* üyeleri) ve bazı bakteri cinsleri de (örn. *Pseudomonas, Agrobacterium*) bilinen selüloz kaynakları arasındadır (Heinze, 2015).

Yenilenebilir kaynağı, ulaşımının kolay olması, toksik olmaması, düşük maliyetli, çevre dostu ve biyolojik olarak parçalanabilirliği, termal ve kimyasal olarak kararlı yapısı nedeniyle selüloz pek çok endüstriyel kullanımda ve geri dönüşüm sorunlarında yerini alabilmiş, umut vaat eden bir substrat maddedir. Ayrıca modifikasyonu sayesinde pek çok

alanda; örneğin tıpta, çeşitli mühendislikler gibi teknik uygulamalarda kolaylıkla entegrasyonu sağlanabilmektedir (Tang ve ark. 2024).

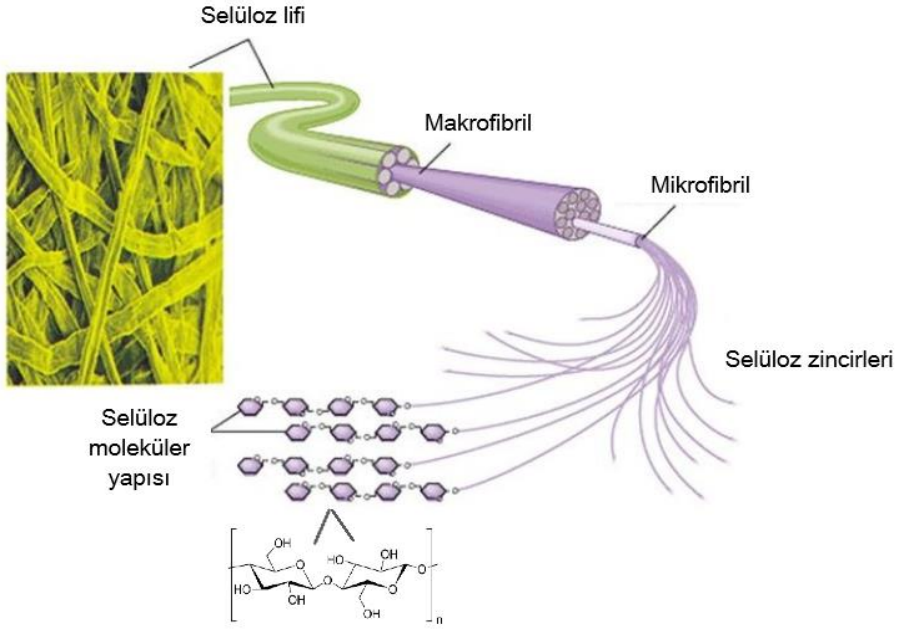
Selülozun keşfine yol açan ilk çalışma, Fransız kimyager Anselme Payen'in çeşitli bitki ekstraksiyonları sonrası elde ettiği lifli maddeyi tanımlamasıyla gerçekleşmiştir. Payen'in selülozu tanımlamasıyla birlikte çok sayıda çalışmalar başlamış ve 1920'lerin başına kadar, selülozun birkaç küçük glikoz ve selobiyoz moleküllerinden oluştuğuna inanılmıştır. Bir polimer olduğuna dair görüşler pek az olmakla beraber bu tartışma yaklaşık on yıl sürdükten sonra, selülozun yüksek molekül ağırlıklı bir makromolekül olduğu kanıtlanmıştır (Hon, 1994).

Selüloz, glikoz moleküllerinin doğrusal bir polimeridir. Glikoz birimleri bireysel olarak, C1 ve C4 karbonları arasındaki glikozidik bağlar yoluyla bağlanmaktadırlar. Anomerik karbon olan C1, β-konfigürasyonuna sahiptir ve her bir glikoz birimi komşu birime göre yaklaşık 180 derece döndürülür. Bu sayede her bir komşu birimle aralarında iki hidrojen bağı oluşur, bu da bir selobiyoz disakkarit yapısını meydana getirir (McNamara ve ark. 2015). Bu selobiyoz birimi, selülozun tekrarlayan birimleri gibi de düşünülmektedir (Krässig, 1993). Kısacası selobiyoz üniteleri, iki anhidroglikoz (AGU) ünitelerinden oluşmakta ve tekrarlanan üniteler ise β- 1,4 glikozid bağı ile bağlanmaktadır (Şekil 2.1). Selüloz molekül formülü $(C_6H_{10}O_5)_n$ olarak ifade edilir ve formüldeki "n", birbirine oksijen bağı ile bağlı anhidro glikoz ünitelerinin sayısını ifade etmektedir.



Şekil 2.1. Selülozun moleküler yapısı (Baghaei ve Skrifvars, 2020).

Yaklaşık olarak 30 ayrı selüloz molekülü, protofibriller (temel fibriller) olarak bilinen daha büyük birimler halinde bir araya getirilir, bunlar da mikrofibriller adında daha büyük birimler halinde paketlenir ve selüloz lifleri halinde bir araya getirilir. Mikrofibriller, selülozun kritalize bir form sergilemesini sağlayan düzenli bir paketleme sistemi göstermiştir ki bu kristal dizi özelliği, su gibi küçük moleküllerin nüfuz etmesini engelleyecek kadar sıkıdır (Hon, 1994; Lynd ve ark. 2002). Mukherjee ve Woods, 1953'te yaptıkları bir çalışmada X-ışını kırınım sonuçlarına dayanarak, her biri yaklaşık 700 nm genişliğinde ve 300 nm kalınlığında dört kristalli sürekli birincil filamanın, yaklaşık 2000 nm genişliğinde ve 1000 nm kalınlığında tüm mikrofibrili oluşturmak üzere bir parakristalin faz tarafından birbirine yapıştırıldığını öne sürmüşlerdir (Şekil 2.2). Ancak son yıllarda negatif boyama teknikleri ve yüksek çözünürlükte yürütülen çalışmalar tüm selülozlarda yaklaşık 35 nm genişliğinde düzenli fibrillerin varlığını göstermiştir. Bunlar, Frey-Wyssling and Mühlethaler (1963) tarafından temel fibriller olarak adlandırılmıştır. Mühlethaler (1960-1969), mikroskobik çalışmalarına dayanarak mikrofibrillerin ortalama 3,5 nm genişliğe sahip izodiyametrik temel fibrillerden oluştuğunu belirtmiştir (Güzel ve Akpınar, 2018).



Şekil 2.2. Selüloz fibrilleri ve moleküler yapısı (Kuokkanen ve arkadaşlarından değiştirilerek alındı, 2018).

Selülozun dört ana formu vardır: I, II, III, IV. Bunlardan selüloz I, genellikle alomorf Iα (bakteri ve alglerde) ve Iβ (yüksek/gelişmiş bitkilerde) şeklindedir selüloz I formları, konsantre haldeki alkali çözeltiler ile birlikte muamele edildiğinde termodinamik açıdan daha kararlı bir kristal olan selüloz II formuna dönüşmektedir. Selüloz III, selüloz mikrokristallerinin amonyakla muamele edilmesiyle elde edilmektedir. Selüloz IV-I ve IV-II ise selüloz III'ün yüksek sıcaklıklarda (yaklaşık 260˚C sıcaklıkta) gliserolde ısıtılması ile meydana gelmektedir (Güzel ve Akpınar, 2018).

2.3. Selülaz

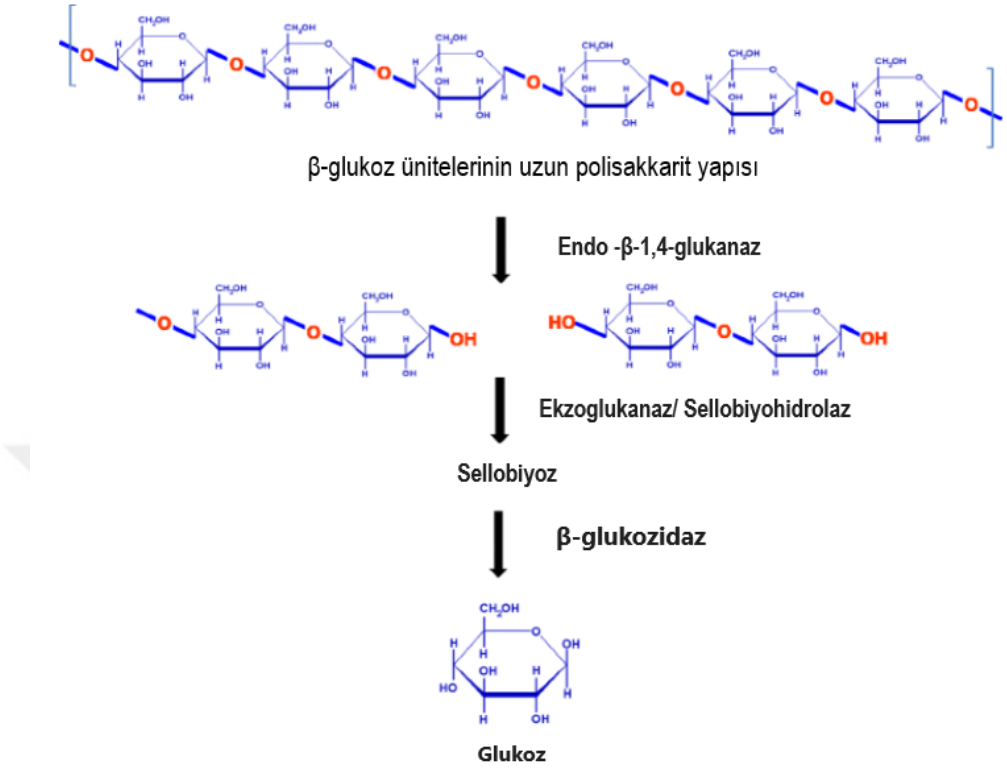
Selülaz çeşitli bakteri, mantar ve protoza türlerlerinden organizmalar tarafından sentezi yapılabilen, temel olarak selülozu ve diğer bazı ilgili polisakkaritleri ve bir madde içinde tüm selülozik bileşenleri parçalayan enzimlerdir (Singh ve ark. 2019).

Selülaz, endüstri ve çevre açısından önemli bir enzimdir; selülozu çözünebilir şekerlere indirgeyerek karbon döngüsünde önemli rol oynar (Wilson, 2009). Selülazlar tekstil,

gıda, yemleme, atık arıtımı vb. uygulamalarda önem arz eden bir endüstriyel enzimdir. Selülazlar esas olarak filamentli mantar türleri ve çeşitli bakteri türleri tarafından üretilirler. *Pseudomonas, Bacillus, Aspergillus, Actinomycetes, Trichoderma* gibi organizmalar hücre dışı selülaz üretebilen türlere örnek olarak verilebilir (Guruk ve Karaaslan, 2020).

Selüloz, glikoz moleküllerinden oluşan bir yapıdır ve bu moleküller birbirine β, 1-4 glikozidik bağ yoluyla bağlanır. Selüloz kimyasallar, enzimler veya her ikisinin kombinasyonu kullanılarak monomere dönüştürülebilir. Bozunmada kimyasal kullanımı, enzimatik bozunmaya kıyasla yüksek sıcaklıklarda daha fazla yan ürün ürettiği ve çevre sorunlarına neden olduğu için ekonomik değildir ve kullanışsız bir yöntemdir.

Selülazlar, β-1,4-glikozidik bağları hidrolize ederek selülozun parçalanmasından sorumludur ve glikozid hidrolaz enzim grubundadır. Selüloz, basit kimyasal bileşenine rağmen çeşitli kristal ve amorf formlar göstermektedir. Heterojenliği ve çözünmezliği, doğal selülozu dirençli bir substrat kılar (Schwarz, 2001; Kiruba ve Thatheyus, 2021). Bu nedenle enzimler tek başına selülozu hidrolize etmekle yetersiz kalmaktadır. Selüloz üretimi yapan organizmalar, bu sebeple çoklu-enzim sistemi kullanmaktadır. Selülaz, endo -β-1,4-glukanazları (EG'ler), sellobiyohidrolazları (CBH'ler) ve β-glukosidazları (Bgls) içeren bir enzim sistemidir. Selülozun tam enzimatik hidrolizi, bu üç farklı enzimin sinerjistik etkisini gerektirir; burada EG'ler, selüloz zinciri üzerinde rastgele kesim yaparak etki eder ve çeşitli uzunlukta selüloz zincirleri (sello-oligosakkaritler) ile sonuçlanır, bu da yeni zincir uçlarını meydana getirir. CBH'ler, selüloz zincir uçlarına etki eder ve selobiyozu serbest bırakır ve Bgls, selobiyozu monomerlerine indirger (Şekil 2.3). Bu üç aktivite, amorf bir substrat olan selülozun parçalanmasını mümkün kılar (Haan ve ark. 2007; Kuhad ve ark. 2011; Zhao ve ark. 2024).



Şekil 2.3. Selülaz enziminin, selüloz üzerine etki mekanizması (Lakhundi, 2015).

2.3.1. Katalitik Alan (CD) ve Selüloz Bağlayıcı Alan (CBD)

Selüloz parçalayıcı enzimlerin çoğu, bir bağlayıcı bölge ile bağlanan bir katalitik ve bir selüloz bağlama alanından (Catalytic binding domain, CBD) oluşan iki alanlı bir yapıya sahiptir. İki alan, her iki alanın etkin bir şekilde yönlendirilmesine ve çalışmasına izin vermek için yeterince uzun ve esnek olan bir bağlayıcı peptit ile birleştirilir.

Bir selüloz probu olarak CBD'nin ana sorumluluğu, enzimi selüloza bağlayıp selülozu parçalayan katalitik bölgeye ulaştırmak ve selüloz yüzeyindeki biyokatalizörlerin maksimum miktarını arttırmaktır. Ayrıca bazı CBD'lerin selülozu kristal formda sindirebilme potansiyelinin olduğu bilinmektedir. Çözünmeyen polisakkaritlerin yanı sıra kristalin selüloza karşı enzimatik aktiviteyi arttırmak için CBD'ler çok önemli bir konumdadır (Carrard ve ark. 2000; Sutaoney ve ark. 2024).

CBD 35 amino asit içerir; bağlayıcı bölgede bol miktarda serin ve treonin amino asitleri bulunur. Bazı CBD grupları tipik olarak kristal polisakkaritleri tanır ve değişmeyen ligand özgüllüğüne sahiptir. Buna karşın bazı gruplar ise farklı karbohidratlara hedeflenen proteinleri içerir. Bu nedenle CBD'ler, protein- karbohidrat tanıma mekanizmasının araştırılması için model sistemlerdir ve çeşitli ligand özgüllükleri bu modellerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmasını sağlar.

CBD' 'lerin aynı kökenli katalitik modüllerin işlevine göre üç temel rolü vardır:

a. Yakınlık etkisi: Substratın yüzeyindeki enzim konsantrasyonunun arttırılmasının, polisakkaritin bozunma hızını artırdığı bilinmektedir.
b. Hedefleme işlevi: Bitki duvarı gibi karmaşık yapılarda polisakkarit hedeflemede bu etkisinden faydalanılmaktadır.
c. Bozucu işlev: Bazı CBD'lerin polisakkarit yapısını bozma kabiliyetine sahip olduğu görülmektedir. CBD''nin, selülozun kristal yapısında katalitik olmayan bozunmaya aracılık ettiği görülmüştür. Bu mekanizma ilk olarak *Cellulomonas fimi*'den Cel6A'nın N-terminal ailesi için raporlanmıştır. (Boraston ve ark. 2004; Shoseyov ve ark. 2006; Sutaoney ve ark. 2024).

2.4. Selüloz Parçalanma Mekanizmaları

Selülozun bozunmasında kullanılan mekanizmalar, kompleks ve kompleks olmayan selüloliz olmak üzere temelde iki tanedir

2.4.1. Kompleks Selüloliz

Bu sistem, genel olarak anaerobik mikroorganizmalar tarafından kullanılır ve sistem, organizmaların yüzeyinde tutunan "selülozom" adlı büyük bir protein kompleksinden oluşur. Selülozom yapısı, bakterilerin selüloza tutunmasına destek olur ve aynı zamanda hücreler tarafından alınan hidroliz ürünlerinin bölgesel bir şekilde salınmasını sağlar. Bu sistem benzersiz bir scaffoldin alt birimi tarafından bir arada tutulan çok sayıda selülaz çeşidi ve ilgili enzimin alt birimlerini içerir. Selülozom iskeleti, multimoleküler yapıdaki kompleksi bir arada tutan büyük polipeptidlerdir. Enzimatik alt birimlerin dockerinleri

(enzim alt birimlerinin selülozom kompleksine olan entegrasyonuna aracılık yapan alan), scaffoldin alt biriminin kohezinleri ile kararlı bir tipte bağlanma gösterir. CBD'nin, iskelet alt biriminin selülozik substratı tanıyıp ona bağlanmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir.

Selülozom yoluyla gerçekleşen selüloliz, oldukça verimlidir ve avantajları şu şekilde sıralanabilir:

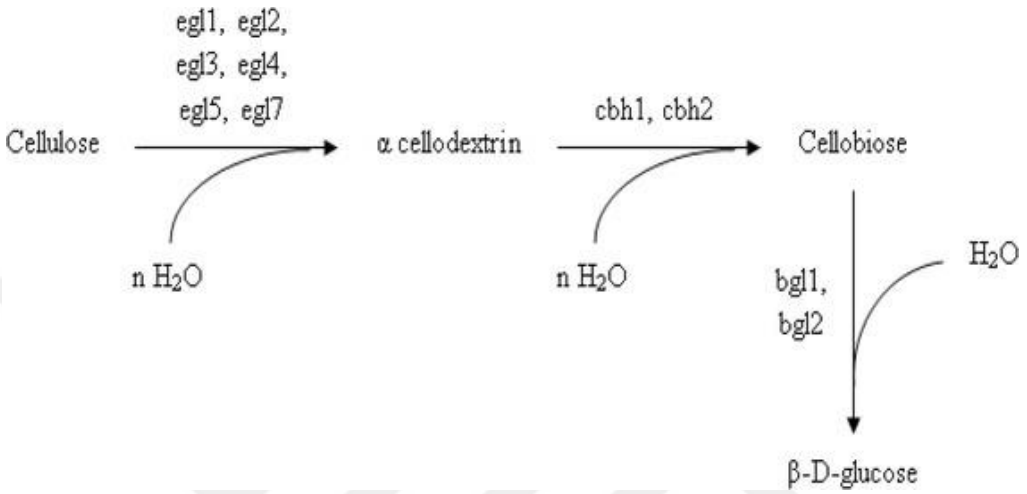
- Bir komplekste farklı spesifikliğe sahip enzimlerin bulunması, bir yapısal selüloz türünün tükenmesi üzerine sürecin durmasını önler.
- Tüm kompleks tek bir hedefe bağlanır, dolayısıyla farklı bileşenler arasındaki rekabet sınırlıdır.
- Selülozomal kompleksin bileşenleri arasında sahip olduğu doğru orantı, sinerjiyi optimize eder.
- Bireysel bileşenlerin optimum aralık ve organizasyonu, üretken olmayan bağlanmayı önleyerek sinerjiyi en üst düzeye çıkarır.
-

Selülozom terimi ilk kez 1983 yılında Lamed ve arkadaşları, anaerobik bir bakteri türü olan *Clostridium thermocellum'*un selülaz enzim sistemini incelerken ortaya atılmıştır. Bununla brilikte selülozomun en iyi karakterize edilmiş örneği *Clostridium thermocellum*'dur (Lakhundi, 2015).

2.4.2. Kompleks Olmayan Selüloliz

Bu sistem çoğunlukla çözünebilir hücre dışı selülolitik enzimleri salgılayan aerobik organizmalarda gözlenir Kompleks olmayan selülaz sisteminde, yaklaşık altı ile on arasında ayrı selülaz enzimi içeren bir set üretilir. Bu enzimler kompleks oluşturmaz. Enzimler selülozu hidrolize eder ve sonuçta hücreler tarafından alınıp metabolize edilen şekerlerin salınımına neden olur. En iyi ve sıkça çalışılan kompleks olmayan selülaz sistemlerine sahip mikroorganizma, aerobik bir mantar olan *Trichoderma reesei*'dir. *T. reesei* selülaz sistemi beş endoglukanazdan (EGI, EGII, EGIII, EGIV ve EGV), iki ekzoglukanazdan (CBHI ve CBHII) ve iki β-glukosidazdan (BGLI ve BGLII) oluşur.

Selüloz, selodekstrinleri serbest bırakan endoglukanazların saldırısına uğrar ve bunlar ayrıca ekzoglukanazlar tarafından selobiyoza parçalanır. Selobiyozun hidrolizi daha sonra glikozu serbest bırakan β-glukosidazlar aracılığıyla gerçekleşir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. *Trichoderma reesei* tarafından selülozun kompleks olmayan hidrolizi. (Lakhundi, 2015).

2.5. Sinerjizm

Sinerjizm, farklı enzim türlerinin iş birliğinin ürün verimini arttırması anlamına gelir. Sinerjistik etki genellikle bir enzim kombinasyonunun kullanıldığı uygulamada, enzimlerin teker teker uygulanmasından çok daha verimli bir sonuç alınmasını sağlamaktadır.

Biyorafineri uygulamalarında farklı sinerji türleri vardır; selüloz hidrolizi için sellobiyohidrolazlar, endoglukanazlar ve β-glukozidaz arasındaki sinerjizm ve ön işleme tabi tutulmuş lignoselülozun sindirilmesi için selülaz, ksilanaz, esteraz ve mannanaz arasında sinerjizm vardır (Li ve ark. 2014).

2.6. Selülazların Sınıflandırılması

Selülaz, katalizlenen reaksiyon türüne göre beş ayrı şekilde sınıflandırılabilen kompozit bir enzimdir.

2.6.1. Endoselülazlar (EC 3.2.1.4)

Endoselülazlar polisakkarit selüloz zincirindeki amorf bir pozisyonda rastgele kesilerek yeni zincir uçları ve oligosakkaritlerin üretilmesini sağlar. Diğer selülaz sınıfları ile karşılaştırıldığında hızlı ayrışma gösterirler ve selüloz üzerindeki viskozite ve zincir uzunluğunda azalmaya yol açan katalizör aktiviteye sahiptirler. Endoglukanaz, bir endoselülaz örneği olarak gösterilmektedir

2.6.2. Ekzoselülazlar (EC 3.2.1.91)

Endoselülazlar tarafından meydana gelen zincirler, açıkta kalan zincirin ucuna yakın bir konumda 1-3 birime daha ayrılarak dissakkaritleri yani selobiyoz oluşturur. Ekzoselülazlar, kendi aralarında tip I ve tip II olarak ayrılırlar. Tip I, polimer zincirin indirgeyici ucunda çalışır ve tip II indirgeyici özelliği olmayan uçlar üzerinde etki yapar. Bu grup selülazlar, hidroksietil selüloz ve karboksimetil selüloz gibi selüloz türevlerini hidrolize edemezler.

2.6.3. β-glukozidazlar

Sellobiaz olarak da adlandırılan bu grup, sellobiyoz ünitesini ayırarak ve glikoz ünitesini oligosakkaritin indirgeyici olmayan ucundan dışarı atarak ekzoselülazı monosakkarit birimlerine ayrıştırır.

2.6.4. Oksidatif Selülazlar

Bu grup, alıcı molekül olarak sellobiyoz dehidrojenazın kullanıldığı reaksiyon mekanizması üzerinde işlev gören polimerik zincirin açılması üzerinde etki gösterir.

2.6.5. Selülaz Fosforilaz

Selülaz fosforilazlar, substratı depolimerize etmekle görevlidir. Bu süreçte reaksiyonda su yerine fosfat kullanılır. (Singh ve ark. 2019; Bhati ve ark. 2020).

2.7. Selülaz Kaynakları

2.7.1. Hayvansal Selülazlar

Pek çok hayvan türü için selüloz, temel besin kaynağıdır. Buna rağmen omnivor ve otoburların çoğu kendi başlarına selülaz üretmezler ve bu nedenle selülolitik mikroorganizmalarla simbiyotik halde yaşarlar. Örneğin geviş getiren hayvanlar, anaerobik koşullar altında selüloz parçalama işlevi gören bakteri ve protozoaya sahip bir sindirim sistemi kompleksine sahiptir. Mikroorganizmalar aynı zamanda, kuşların ve geviş getirmeyen otçul memelilerin çoğunda selüloz sindirimine de yardımcı olur (Smant ve ark. 1998). Tüm bunlar, gelişmiş hayvanların endojen selülaz üreticisi olmadığını göstermiştir. Simbiyotik olarak bulunan protozoa ve bakteriler, omurgasızlarda ve geviş getiren hayvanlarda selüloz sindirimini açıklar. Cleveland, 1924'te termitler üzerine yaptığı bir çalışmada, bir yeraltı termiti olan *Reticulitermes flavipes* ile simbiyotik yaşayan protozoanın bağırsaklarını çıkartmış ve böylece söz konusu termitin popülasyonunun yok olduğunu saptamıştır. Böylece, protozoanın konak canlı üzerindeki selüloz sindiriminden sorumlu olduğu sonucuna varmıştır. Böylelikle bu teori, gelişmiş hayvanların selüloz sindirimi için kullanılan bir açıklama haline gelmiştir.

Eklembacaklıların yanı sıra salyangoz, deniz salyangozu (ve "winkle" da denilen yaygın deniz salyangozu) ve bazı çift çenetliler da dahil olmak üzere yumuşakçalarda da çeşitli selülaz çalışmaları yapılmıştır.

Yapılan bazı çalışmalarda hepatopankreas, yumuşakçalarda gastrik dişler ve çift çenetlilerin midesinde iğne benzeri kristalin yapılar gibi olası endojen enzim kaynakları bildirilmiştir. (Xu ve ark. 2000; Watanabe ve Tokuda, 2001)

2.7.2. Fungal Selülazlar

Mantarlar, selüloz parçalayıcı grubun önemli bir kısmını oluşturmakla beraber, doğadaki selülozun yaklaşık %80 kadarını parçalamaktadır; özellikle de mantarların biyokütle

ayrışmasında önemli görev üstlendiği orman ekosistemleri. Selülozu parçaladığı bilinen mantar türleri *Ascomycota, Basidiomycota üyelerini, Myrothecium, Humicol*a, *Stachybotrys, Cladosporium, Alternaria, Acremonium, Ceratocystis* üyelerini ve bazı hayvanların rumeninde karşılaşılan kitrid mantarlarını (*Chytridiomycota*) kapsar.
Aerobik mantarların, büyük miktarlarda hücre dışı selülaz salgılaması dikkat çekicidir. Bu özellikleri aerobik mantarların, hücre yüzeyine bağlanan çoklu enzim komplekslerini, yani selülozomu sentezleyen anaerobik mantarlarla kıyaslanmasını ve endüstride kullanılabilir olmasını sağlar.

Selülazlar *Aspergillus, Trichoderma, Penicillium* gibi farklı aerobik mantarlar tarafından elde edilip ve karakterize edilmiştir. (Wood, 1985; Ahmed ve Bibi, 2018).

2.7.3. Mikrobiyal Selülazlar

Mikroorganizmalar, yaşamın ve canlılığın vazgeçilmez parçasıdır. Mikroorganizmalar yeryüzünde çok çeşitli ve ekstrem habitatlarda yayılım göstermektedir. Bu nedenle kapsamlı bir şekilde araştırılmış olup çeşitli kullanım amaçları için çeşitli enzimler ve biyoaktif maddeler üretmek için yararlanılmıştır. Bunlar kendilerine özgü genetik adaptasyonlara sahip çok çeşitli ve fonksiyonlu selülolitik enzimlerin kaynağı olarak bilinmektedir. (Thapa ve ark. 2020; Singh ve ark. 2023). Selülazlar ve ksilanazlar ekstrem koşullar ile birlikte geviş getiren hayvanların işkembesinde, toprakta, böcek/termit bağırsaklarında ve denizlerde yaşayan çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilir. Bu mikroorganizmalar çeşitli mantar ve bakteri çeşitlerini kapsar. Bakteriler, aktinomisetler ve mantarlar gibi mikropların topraktaki selülozik malzemenin bozulmasında önemli payları bulunmaktadır. Bunlar arasında en çok araştırma yapılan selülaz üretici mikroorgamizmalar C*lostridium, Bacillus, Pseudomonas, Cellulomonas, Trichoderma* ve *Aspergillus* cinsleri olmuştur (Thapa ve ark. 2020).

Mikroplarda selülaz ifadesinin rastgele mutajenez yoluyla arttırılması sıkça kullanılan bir yöntemdir. Selülazların ekspresyonu, belirlenen çoklu transkripsiyon faktörleri tarafından sistematik olarak düzenlenir.

Hem metabolik hem de enzim mühendisliği yöntemlerinin hedeflenen mikroplardan selülaz salgısının verimliliğini ve aynı zamanda substrat spesifikliğini arttırdığı düşünülmektedir (Paul ve ark. 2021).

2.7.4. Bakteriyel Selülazlar

Prokaryotlar arasında çok sayıda toprak bakterisi ve bitki patojeni, selülolitik enzimler üretebilmektedir. Ancak nispeten pek azı karbon kaynağı olarak kristalin selülozundan yararlanmaktadır. Bununla birlikte selülolitik bakteriler tarafından üretilen selülazlar, *Trichoderma reesei* gibi mantarlardan elde edilene göre birkaç kat daha düşük miktardadır ki bu, biyokimyasal çalışmalarda bir sıkıntı teşkil etmiştir. Ancak bazı bakterilerin çok yüksek selülaz aktivitesine sahip olabildiğinin keşfedilmesi ve bakterilerin mantarlara göre daha yüksek büyüme hızı göstermesi, bu alandaki çalışmaların önünü açmış ve endüstride bakteriyel selülaz üretimine olan ilgi artmıştır (Beguin ve ark. 1992; Shaikh ve ark. 2013). Bakteri kaynaklı selülazlar, onları salgılayan bakterilerin yüksek büyüme hızı ve doğal çeşitliliği nedeniyle ilgi çekicidir. Daha da önemlisi bakteriler, çevresel streslere son derece dirençli selülolitik suşları seçebilmemizi sağlayan çok çeşitli çevresel nişlerde yaşarlar. Örneğin termofilik, psikrofilik, alkalifilik, asidofilik özellikteki bakteriler selülolitik aktivite gösterebilmektedir. Üstelik bu koşullar altında genellikle stabil enzimler üretilir. Çeşitli ortama uyum sağlayıp selülaz üretebilme potansiyelleri, bakterileri endüstrinin pek çok alanında enzim üreticisi olarak kullanımını artırmıştır.

Selülaz enzimi üretimi için hem aerobik hem de anaerobik olarak kategorize edilen çeşitli bakteriler raporlanmıştır (Thapa ve ark. 2020; Balla ve ark. 2022). Aerobik ortamda sülülaz üretim potansiyeli gösteren mikroorganizmalar arasında *Bacillus, Cytophaga, Serratia, Pseudomonas, Thermoactinomyces, Sporocytophaga* ve *Streptomyces* sayılabilir. (Sarıçam ve Baylan. 2023). Anaerobik selülolitik bakteriler ise *Bacteroides cellulosolvens, Bacteriodes succinogenes, Clostridium thermocellum, Acetivibrio cellulolyticus, Ruminococcus albus* ve *Ruminococcus flavefaciens* olarak bildirilmiştir (Saranraj ve ark. 2012). Bu bakteriler arasında *Bacillus* sp. endüstriyel biyoteknolojide

oldukça ilgi çeken bir suştur. Özellikle selülazların üretimi için genellikle kolay ve hızlı bir şekilde kültüre edilebilir, besin gereksinimleri çok az olmasına rağmen büyük miktarda enzim üretme kapasitesine sahiptir. Bu genustan *B. subtilis, B. macerans* ve *B. licheniformis* türleri endüstriyel olarak da kullanılabilen yüksek selülaz aktivitesi gösteren bakteriler olarak rapor edilmişlerdir (Balla ve ark. 2022; Sarıçam ve Baylan, 2023).

2.7.5. Bitkisel Selülazlar

Selülaz eldesi, transgenik bitkiler kullanılarak çeşitli endüstriyel amaçlar için de yapılmaktadır. Örneğin *Asidothermus cellulolyticus* adlı bakteriden üretilen selülaz E1 enzimi, transgenik bitkilerde üretilen endoglukanaz için yaygın bir örnektir. Selülaz E1 enziminin bitkilerden eldesinin temel sebeplerinden biri, hipertermofilik bir enzim olup optimal aktivite sıcaklığının 81°C olarak rapor edilmesidir. Bu sayede E1 enzimi bitki büyümesine uygun sıcaklıklarda aktif olmayıp, gerektiğinde ise (örneğin bitkilerden biyoyakıt üretiminde) yüksek sıcaklıklarda, aktif halde selülaz üretmeyi desteklemektedir.

Bu görüş mısır, pirinç, şeker kamışı ve tütün gibi konakçı bitkilerde selülaz enziminin moleküler tarımını açıklamaktadır. Parçalanma için daha etkili olacak şekilde uyarlanmış hücre duvarlarına sahip bitkiler de rapor edilmiştir. Tütün, E1 enzimini eksprese ettiği rapor edilen ilk bitkidir. Bugüne kadar, selülaz E1'i eksprese eden birçok farklı transgenik mahsul türü üretilmiştir, transgen ekspresyon seviyeleri ve bitki gelişimi üzerindeki etkisi açısından büyük ölçüde farklılık gösterebilir (Hefferon, 2017).

2.8. Endüstriyel Selülazlar

Selülaz enziminin ticari olarak otuz yılı aşkın süredir kullanılmasına rağmen, bu enzim hala hem akademik araştırmalar hem de endüstriler için ilgi konusu olmaya devam etmektedir. Selülazın yapısı ve etki şekli kapsamlı bir şekilde çözülmüştür ve bu nedenle 'selülaz' terimi artık uygulanabilir bir tanıma sahiptir. Tekstil, hayvan yemi, ilaç, deterjan

ve kağıt işleme endüstrisindeki geniş çaplı uygulamaları, onları iş hacmi bazında küresel endüstriyel enzim pazarında önemli bir konumda olmasını sağlamıştır (Ahmed ve Bibi, 2018; Ejaz ve ark. 2021; Anonim, 2023a).

Endüstriyel olarak oldukça elzem olan enzim preparatlarından biri olan selülaz enzimleri, biyoyakıt üretimi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, deterjan endüstrileri, hayvan yemleri gibi farklı endüstrilerde çok büyük uygulamalara sahiptir. Gelecekte selülazın biyo-rafineride, atık arıtımında, ve biyolojik iyileştirmede uygulanması amacı ile daha fazla araştırma yapılması planlanmakta ve bununla beraber pek çok kritik endüstride umut vaat etmektedir (Ma ve ark. 2024).

2.8.1. Tekstil Endüstrisi

Selülazların en popüler uygulaması kotların biyotaşlanması, biyolojik olarak parlatılması ve kumaşların görünümünü iyileştirmek için tekstil endüstrisinde kullanılmasıdır (Ejaz ve ark. 2021). Selülazla kumaş yıkama, pamuklu dokularda ve kot kumaşlarda hoş ve lekesiz bir görünüm elde etmek için yaygın olarak kullanılan çevre dostu bir işlemdir.
Selülazlar, biyo-parlatma sırasında kumaş yüzeyinde çıkan küçük liflerin uçları üzerinde etki gösterir; burada mekanik bir etki göstererek bu lifleri uzaklaştırır. Böylece hidrofiliklik, nem tutuculuğu ile birlikte parlak ve pürüzsüz bir görünüm elde edilirken bu proses çevre dostu bir şekilde gerçekleştirilmiş olur (Korsa ve ark. 2023). Ayrıca selülaz enzimiyle biyoparlatma işlemi uygulanan ürünlerde nem oranının yaklaşık %6 kadar arttığı rapor edilmiştir. Yüzey yumuşaklığı, esnekliğin geliştirilmesi, yıkamaya dayanıklılık ve kullanım sırasında neps (kumaşlarda oluşan lif düğümcüğü) oluşumunu engellemede selülaz enzimi iyi bir performans sergilemektedir (Doğan, 2015).

Tekstil endüstrisinde kullanılan günümüz temizleme yöntemleri kimyasal bazlı olup hayli alkali özelliktedir. Ayrıca atık sulardaki BOD (Biyolojik oksijen gereksinimi), COD (Kimyasal oksijen gereksinimi) ve TDS (suda bulunan çözünmüş katı madde miktarı) düzeylerinin yüksek olduğu ve bu sebeple mevcut prosedürlerin çevreye zarar verdiği rapor edilmiştir. Enzimler kullanarak kumaşlardaki yabancı maddeleri uzaklaştırmanın

çevre dostu bir alternatifi olan biyo-yıkama işlemi, ekolojik etkiyi azaltıp temizleme verimliliğini artırmak için son yıllarda üzerinde çalışılan bir uygulamadır.

Tekstilde enzim kullanımının diğer bir örneği ise yün karbonizasyonudur. Yündeki bitkisel artıklar genellikle karbonizasyon olarak adlandırılan kimyasal bir işlemle uzaklaştırılmaktadır. Yün liflerinde kullanılan bu karbonizasyonu ile sülfürik asit kullanımı ve ağartma işlemleri hem çevre yükü fazla olan hem de yüne zarar verebilecek bir işlemdir. Yünün selülaz ve pektinazlarla enzimatik muamele edilmesi bitkisel maddenin ayrışmasını ve kolayca uzaklaştırılması işlemini hızlandırabilir ve karbonizasyon işlemi için gereken sülfürik asit miktarını azaltabilir.

Yapılan çalışmalarda farklı oranlarda karışım olan pamuk/yün kumaşları, proteaz ve selülaz enzimleri ile muamele edilmiş ve kopma mukavemeti kaybı (%12–18), sürtünme dayanımı kaybı ve ağırlık kaybını (%66,5) saptanmıştır. Yapılan işlem ile boncuklanma ve çekme dayanımı ile buruşmazlık artmıştır.

Bununla birlikte biyo-yıkama, biyolojik haşıllama ve ağartma gibi yaygın kullanılan endüstriyel işlemlerde biyoteknoloji alanında atılımlar yaşanmıştır ve birtakım değişikliklere yol açmıştır. Kimyasal yöntemlerden ziyade, kullanılan mikrobiyal selülazlar yaş tekstil hazırlık işlemlerinde daha iyi performans göstermektedir (Ekmekçi Körlü ve ark. 2007; Korsa ve ark. 2023).

2.8.2. Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisi

Kağıt endüstrisi, küresel ekonominin önemli bir parçası olup işlenmemiş hammaddelerin büyük bir tüketicisidir ve çevresel bozulmadaki payı nedeniyle önemli eleştirilerle karşılaşmaktadır (Kinuthia, 2016). Selülaz, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde ticari olarak istikrarlı bir şekilde büyümesi ve yeni olasılıklara yol açması için muazzam bir uygulama potansiyeline sahiptir. İleriye yönelik yapılan çalışmalar artan kağıt hamuru verimi, geliştirilmiş lif özellikleri, gelişmiş kağıt geri dönüşümü, azaltılmış işleme ve çevre sorunları ve enerji verimliliği gibi çeşitli alanlarda kağıt hamuru ve kağıt

endüstrisine faydalar sağlamak için selülazların kullanımlarını geliştirmeyi amaçlamaktadır (Singh ve ark. 2016). Enerjinin selülaz enzimi ve kimyasallar tarafından azaltılması, kağıdın kalitesini artırmak ve kağıt hamuru üretiminin çevresel etkisini azaltmaya yardımcı olmak için kullanılmaktadır. Yakın gelecekte biyoyakıt ve biyoenerjinin ticari üretimi için selülazlara duyulan ihtiyaç ciddi şekilde artacaktır (İmran ve ark. 2016).

Odunsu materyalin öğütülmesi ve rafine edilmesini kapsayan mekanik hamurlaştırma işlemi genellikle yüksek enerji tüketimiyle ilişkilendirilir (Sharma ve ark. 2016). Mekanik işlem, yüksek sertlikte ve miktarda ince taneli kağıt hamur üretirken, üretimde selülaz enzimi kullanımının %20-40 kadar enerji tasarrufu sağladığı bilinmektedir. Kuhad ve arkadaşları, 2011'de yaptığı çalışmada selülaz kullanımının, ksilanazla karşılaştırıldığında, en son aldığı parlaklık seviyesini iyileştirmek ve yumuşak ağaç kraft hamurunun ağartılabilirliğini arttırmak gibi pek çok avantaj sunduğunu bildirmiştir. Özellikle *Aspergillus niger* ve *Trichoderma reseei'*den elde edilen mantar selülazları bu amaçla kullanılmaktadır (Ejaz ve ark. 2021).

Biyo-mürekkep gidermenin temel avantajı, işlem sırasında alkali kullanımının önlenmesi ve sonuç olarak elyafın sararmasının önlenmesidir. Selülazların tek başına veya hemiselülazlarla kombinasyon halinde, karbohidrat kısmının kısmen hidrolize edilmesi yoluyla mürekkebin lif yüzeyinden salınması etkili bir şekilde gerçekleştirilir. Asidik enzimlerin, lif parlaklığının yanı sıra alkali sararmayı önledikleri için uygulamada bazik ve nötr olanlardan daha iyi sonuç verdiği bilinmektedir. Enzimatik mürekkep gidermenin temiz görünüm, gelişmiş parlaklık ve lifin geliştirilmiş mukavemetinin yanı sıra çevre kirliliğine daha az katkıda bulunma gibi çeşitli avantajları olduğu rapor edilmiştir (Jayasekara ve Ratnayake, 2019).

2.8.3. Çamaşır ve Deterjan Endüstrisi

Selülazlar ayrıca enzim satışı için en popüler pazarlardan biri olan çamaşır ve deterjan endüstrisinde %20-30 oranında kullanılmaktadır (Ahmed ve Bibi, 2018).

Deterjandaki toksik fosfat ve silikatların kullanımının önüne geçmek ve yüksek enerji kullanımını azaltmak amacı ile selülazlar, lipazlar, proteazlar ve amilazlar deterjan endüstrisinde kullanılır hale gelmiştir. Selülaz enzimi, tekstil lifleri arasındaki boşluklardan geçerek kirin kumaşa zarar vermeden uzaklaştırılmasını ve pürüzsüzlüğünü sağlar, bu sayede kumaşın kalitesi korunur. Ortam sıcaklığında ve düşük sıcaklıkta aktif olan alkali selülazların endüstride kullanımı çevre dostudur ve insanlar için toksik olan bileşenlerin kullanımı azaltır.

Şu anda üretilen hemen tüm toz ve sıvı deterjanlara deterjan enzimleri eklenmektedir. Bu uygulama, deterjan formülasyonunda enzimlerin kullanımını uygun maliyetli hale getirir. Deterjan endüstrilerinde piyasada selülazlara yönelik yüksek bir talep bulunmaktadır. Mantarlar endüstriyel kullanım için önemli hücre dışı enzimlerin üreticileridir. Mantar ve bakteri selülazları ile yıkanan giysilerin şeklini ve rengini koruduğu gözlenmiştir. Mantar selülazları, defibrilasyon işlemlerine yardımcı olmak için deterjan preparasyonunda önemli bir şekilde kullanılır. Kumaşın renk parlaklığını ve yumuşaklığını artırırken defibrilasyon maliyetini en aza indirirler. Selülazlar, deterjan hazırlamada mantar veya bakteri proteazları, amilazlar ve lipazlar dahil olmak üzere diğer enzimatik deterjanlarla birlikte kullanılır. Bu dört enzimatik deterjanın kombinasyonu, kirden kaynaklanan tüm kirlerin giderilmesini kolaylaştırır ve tüm kumaşların kalitesini korur. Kumaş ve giysilerin yıkanması için piyasada Carezyme®, Celluzyme® ve SaniZyme® gibi markalaşmış selülazlar mevcut (Niyonzima, 2021). Bakterilerden *Bacillus* sp. suşları, mantarlardan *Trichoderma* sp. suşları (örneğin; *T. reesei, T. longibrachiatum, T. viride,* ve *T. harzianum* türleri), *Aspergillus niger*, *Humicola* (örneğin; *H. griseathermoidea* ve *H. insolens* türleri) deterjan endüstrisinde çok kullanılan mikrobiyal selülaz üreticileridir (Jayasekara ve Ratnayake, 2019; Niyonzima, 2021).

2.8.4. Gıda ve Hayvan Yemi Endüstrisi

Gıda endüstrilerinde, ksilanaz ve pektinaz enzimleri ile kombinasyonu halinde selülaz, sebze ve meyve sularında enzimatik ekstraksiyon ve arıtma amacı ile çokça kullanılmaktadır. Bunlar genellikle meyve sularında viskozite azaltmada ve aromatik

özelliklerin geliştirilmesinde iyi bir performans sergilerler. β -glukosidaz ve pektinazların etkisi, sebze ve meyvelerin aroması ve uçucu özellikleri gibi ek karakterlerin yanı sıra tat ve dokuda da iyileştirmeleri sağlar. Aynı zamanda selülaz, bira ve şarap fabrikalarında arpa maltının iyileştirilmesinde de tercih edilmektedir.

Selülaz, hayvan yemi endüstrisinde, kümes hayvanlarının yem üretiminde ve besin değerlerini artırmak için hemiselülaz ile kombine şekilde kullanılmaktadır. Hayvanlar tarafından alınan kısmen sindirilmiş yem, hayvanların daha iyi büyümesini sağlayacak ek besinler içerir (Singh ve Sharma, 2020; Bhati ve ark. 2020)

2.8.5. Tarım Endüstrisi

Çeşitli tarımsal atıklarda en çok bulunan polimer selülozdur. Atıklar, içinde bulunan selülozun parçalanması yoluyla farklı faydalı ürün elde edilebilmektedir. Bu parçalanma olayı selülaz enzimi sayesinde gerçekleşir. Selülaz, pektinaz ve hemiselülazın farklı kombinasyonlarından oluşan enzim uygulamaları, tarım endüstrisinde mahsullerin büyümesini desteklemek ve çeşitli bitki hastalıklarına karşı mahsulleri koruyup tedavi edebilme potansiyeline sahiptir. Bazı mantar türlerinden elde edilen selülaz enzimi bitki patojenlerinin hücre duvarını parçalayarak çeşitli bitki hastalıklarını kontrol edebilmede kullanılmaktadır. *Chaetomium* sp., *Trichoderma* sp., *Geocladium* sp.ve *Penicillium* sp. dahil olmak üzere pek çok selülolitik olan mantar türü, tohum çimlenmesini geliştirir, bitkinin büyüme ve çiçeklenmesini kolaylaştırır, kök sisteminin iyileşmesini sağlar ve artan ürün verimini artırır. Aynı zamanda selülazlar, toprağa saman ilavesi gibi çeşitli tarımsal atıkların uygulanmasıyla toprağın kalitesini artırma ve gübre ihtiyacını azaltma özelliğine sahiptir (Kuhad ve ark. 2011; Singh ve Sharma, 2020).

2.8.6. Biyoyakıt Endüstrisi

Selüloz, insanlığın yararına kullanılabilecek en bol hammadde olarak kabul edilmektedir ve monomer glikozunun β, 1-4 bağlantısıyla bağlandığı bir biyopolimerdir. Selülozun tamamen parçalanması, ürün olarak fermantasyon yoluyla etanole dönüştürülebilen

glikozu verir. Artan nüfus ve sanayileşme, sıvı fosil yakıtlara olan talebin artmasına neden olmuş ve bunun sonucu olarak sera gazı emisyonunun arttığı gözlenmiştir. Biyoetanolün lignoselülozik biyokütleden enzimatik olarak üretilmesi, biyoyakıt üretiminin çevre için sürdürülebilir bir çözüm olması açısından tercih edilen yol olmuştur. Selülaz üretimine yönelik biyoproseslerdeki araştırmalar ve gelişmeler sebebiyle elde edilen selülazın maliyeti düşürülmüş ve bu da biyoetanol üretiminin dünyanın çeşitli yerlerinde ticarileştirilmesine yol açmıştır (Singhania ve ark. 2021). Ancak bu üretim prosesinin en büyük dezavantajı lignoselülozik biyokütlenin yapısıyla ilişkilidir. Bir bütün olarak çok kararlı bir yapıya sahip olan lignin, selüloz ve hemiselülozdan oluşur. Bu substrattan fermente edilebilir şekerlerin salınması için, stabil yapıyı kıracak bir ön işleme tabii tutulmalıdır (Jayasekara ve Ratnayake, 2019).

2.9. *Bacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Basil sözcüğü, genel olarak çubuk/ çomak şeklindeki bakterileri temsil eder. Dilimize Fransızca'daki "Bacille" sözcüğünden geçse de, kökeni latince olup "küçük çubuk" anlamındaki "Bacillum" sözcüğüdür. Basil, bir bakteriyoloji terimi olarak ilk kez Alman biyolog Ferdinand Julius Cohn tarafından 1853'te kullanılmıştır.

Alman biyolog Ferdinand Julius Cohn, gözlemlediği bazı bakterileri morfolojisinden dolayı çubuğa benzetmiş ve basil, bakteriyoloji terimi olarak ilk kez 1853'te Cohn tarafından kullanılmıştır (Anonim, 2023b).

Bacillaceae familyasına ait olan *Bacillus* cinsi çomak şeklindedir ve vejetatif hücrelerin boyutları 0,5×1,2 µm ile 2,5×10 µm çapları arasında değişiklik gösterebilmektedir. Gram-pozitif, endospor oluşturma yeteneğine sahip, aerobik veya fakültatif anaerobik bir bakteri grubudur (Kuşaklı, 2011). Çoğunlukla 30-45°C arasında optimum büyüme gösterip mezofilik olmakla beraber termofilik ve psikrotrof türleri de olduğu bilinmektedir. Hücre başına bir endospor oluştururlar ve bu sporlar soğuğa, sıcağa, çeşitli dezenfektan maddelere, radyasyona karşı dirençlidir. Bu nedenle tıbbi malzemelerden uzaklaştırılması zor olduğundan sıkça kontaminasyon sebebi olarak bilinmektedir.

Bacillus suşları Gram-pozitif olarak bilinse de, bazı türler gençken gram-pozitif, yaşlanınca gram-negatif özellik gösterebilmektedir. Cinsin pek çok türü genel olarak toprak ve suda yayılım gösterir fakat fizyolojik özellikleri sebebiyle yaşama alanları geniş bir yelpazeye sahiptir (Turnbull, 1996; Ayhan, 2000). *Bacillus* normal nutrient agarlı ortamda kültürlendiğinde hafif pürüzlü kenarlı, sarımtırak ya da beyaz, iri koloni morfolojileri göstermektedir (Lu ve ark. 2018). Bazı *Bacillus* türlerinde ince, uzun, dalgalı, fazlaca esnek ve sarmal yapıda bir hareket organeli olan "flagella" bulunmaktadır. *B. anthracis*'de hiç flagella bulunmuyorken, *B. cereus* ve *B. subtilis* suşlarında fazla miktarda flagella gözlenmiştir (Rosovitz ve ark. 1998; Seneath, 1986; Arda, 2000).

Bacillus türlerinin çoğunluğu bir non-patojenik bir yapı gösterse de, parazitik ve patojenik olan türleri de mevcuttur. Bunlardan *B. anthracis*, omurgalılarda bir şarbon etkenidir; *B cereus* ise insanlarda ve çiftlik hayvanlarında patojenik etki gösterebilmektedir, ancak *Bacillus* türlerinin büyük çoğunluğu zararsız saprofitlerdir (Turnbull, 1996).

Bir süredir *Bacillus* ve metabolitleri, enzimler de dahil olmak üzere antibiyotik üretimi, fermente gıdaların hazırlanması ve haşere kontrol ajanları vb. olmak üzere çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda çokça kullanılmıştır. Son zamanlarda *Bacillus* türleri, çeşitli gıda ürünlerine giderek daha fazla dahil edilmektedir, çünkü bağırsak mikrobiyal dengesinin iyileşmesi safra ve asit direnci ve insanlar için faydalı farklı bileşikleri sentezleme yeteneklerinden dolayı probiyotik eldesi için kullanılmaktadır (Nithya ve Halami, 2013).

Bacillus cinsinin birçok suşu, antimikrobiyal etkiye sahip çok sayıda madde üretmektedir. Bunlardan *Bacillus subtilis* 70'ten fazla farklı antibiyotik üretir ve metabolitlerinin birçok fitopatojen mikroorganizmaya karşı antibakteriyel veya antifungal aktivite gösterdiği bilinmektedir (Todorova ve Kozhuharova, 2010). Basitrasin ve polimiksin, *Bacillus'*tan elde edilen antibiyotiklerdir (Turnbull, 1996). İnsan vücudundaki metabolik süreçlerin sağlıklı bir şekilde çalışmasını sağlayan vitaminlerden kobalamin ve inositolün mikrobiyal eldesi için, *Bacillus megaterium ve Bacillus subtilis* suşlarının konakçı olarak

kullanılabildiği, yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkmıştır. Bu yapılan çalışmalar, ekonomik olarak dezavantaj sağlayan ve uzun bir proses gerektiren kimyasal üretime karşı *Bacillus* suşları kullanılarak yapılan mikrobiyal üretim daha ekonomik bir alternatif oluşturmuştur (Mohammed ve ark. 2014; Tanaka ve ark. 2014).

Geçerli olarak yayınlanmış ve doğru isme sahip alt takson sayısı 109 iken, eş anlamlı adlandırmaları kapsayan tanımlanmış alt takson sayısı ise 632'dir (LPSN'e göre, bacterio.net).

2.9.1. *Bacillus*'tan Elde Edilen Selülazlar

Biyoenerji ve biyoproses endüstrilerindeki büyük önemlerinden dolayı mikrobiyal selülaz enzimlerine olan talep sürekli artmaktadır (Shyaula ve ark. 2023). Mikrobiyal selülazlar, karmaşık yapıları ve endüstride yaygın şekilde kullanılmaya başlanması nedeniyle ana biyokatalizörler haline gelmiştir (Malik ve Javed, 2021).

Selülaz multi-komponent, yani çok bileşenli bir enzimdir ve bileşenleri önemli derece farklılık gösterebilmektedir. Bununla birlikte, selülazın etki ettiği subsratlar da kompleks bir yapıdadır. Bu nedenle selülaz enzimi aktivitesinin değerlendirilmesi için çok çeşitli metodolojik çalışmalar yürütülmüştür. Yapılan çalışmalarda, her selülaz yapısının aynı olmadığını, farklı selülaz enzimleri için farklı reaksiyon süreleri, substrat konsantrasyonları, pH ve sıcaklık stabilitesi gerektiğini öne sürülmüştür (Wang ve ark. 2017).

Çeşitli bakterilerden elde edilen selülaz enzimleri için bulunan optimal koşullar farklıdır: *Bacillus licheniformis* için optimum şartlar pH 6,5 ve 45°C'de 48 saatlik inkübasyonun ardından elde edildi. Shaid ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp.'den elde ettikleri sonuçlar ile tutarlıydı (Shyaula ve ark. 2023). *Bacillus subtilis* suşları, enzimin termal stabilitesini genellikle 50-60°C arasında koruyabilmekte olup, en yüksek aktiviteyi 60°C'de göstermiştir. Bu sıcaklık daha sonra standart enzimatik analizler için kullanılmıştır. Suşlar, genellikle 4.0-5.5 pH değerleri arasında yüksek aktiviteye

sahipken, maksimum verim pH 5.0'te tespit edilmiş ve bu aralığın dışındaki değerlerde, özellikle bazik koşullarda aktivite kaybı gözlenmiştir. Alınan sonuçlar ile birlikte SDS-Page ve Zimogram analizi de, bakteriyel selülazın mantar selülazlarından farklı olduğunu yeniden göstermiştir. *Bacillus* suşlarında selülaz enzimi üretimi için yapılan çalışmalarda, CMC'nin diğer doğal substratlara göre selülaz için en iyi indükleyici olduğunu bildiren Sajith ve arkadaşlarının (2014) sonuçlarıyla uyumlu veriler elde edilmiştir (Malik ve Javed, 2021).

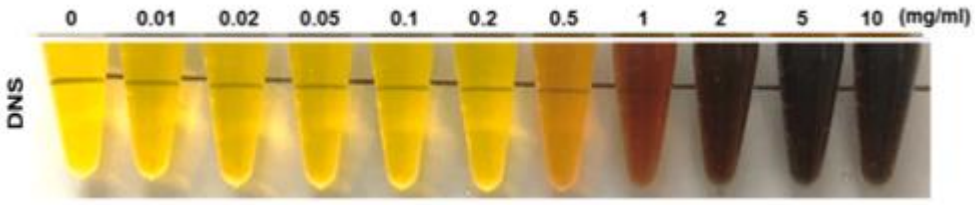
Selülaz, indüklenebilir bir enzimdir ve bu özelliği indükleyici görevi gören substratın varlığına bağlıdır. Maksimum aktivite, kültür ortamı CMC ile desteklendiğinde elde edilmiştir fakat kültür ortamında farklı karbon kaynaklarında da *Bacillus*, yüksek verimli selülaz enzimi üretebilir. $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4$, NaCl, maya özütü, kültür ortamlarında tercih edilebilen karbon kaynaklarıdır (Lugani ve ark. 2015).

2.10. 3,5-Dinitrosalisilik Asit (DNS) Yöntemi

İndirgen şekerlerin tanınması, değerlendirilmesi için pek çok farklı koloritmetrik yöntem keşfedilmiştir. Bunlardan biri de 3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS veya DNSA) yöntemidir. Bu, uygulanması kolay bir yöntemdir ve kısa sürede çok örneğin tayininde kullanılabilmesi yöntemin tercih sebepleri olmaktadır (Deshavath ve ark. 2020). DNS, güçlü bir şekilde indirgeyici şekerler ve indirgeyici moleküllerle reaksiyona girerek 3-amino-5-nitrosalisilik asit oluşturan bir aromatik bileşiktir. Bu yöntemin kullanılması ilk olarak, Amerikalı bir biyokimyager olan James B. Sumner tarafından idrardaki indirgeyici maddelerin tespitini yapmak üzere yaptığı bir çalışma ile olmuştur (Anonim, 2024c).

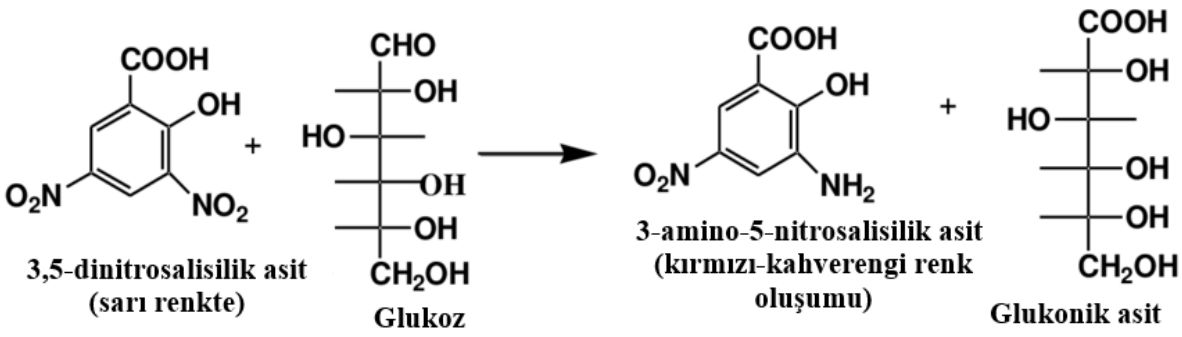
İndirgeyici şeker, indirgeyici madde olarak görev yapan ve oksitleyerek başka bir moleküle etkili bir şekilde elektron verebilen şekerlerdir. Molekülün serbest anomerik karbona sahip ucuna indirgeyici uç adı verilir. Şeker molekülleri, serbest aldehit (–CHO) ve keton (–CO-) grubu içerdikleri ve açık zincir yapısında bulundukları için indirgeyici ajan görevi görürler (Anonim, 2024d).

DNS, indirgeyici şekerlerde serbest karbonil grubunun (C=O) varlığını tespit eder. Bu, aldehit fonksiyonel grubunun (glukozda) ve keton fonksiyonel grubunun (fruktozda) oksidasyon olayını kapsar. Bu reaksiyon esnasında DNS, alkali koşullarda kırmızımsı bir kahverengi renkte bir komplekse dönüştürülen 3-amino5-nitrosalisilik asit (ANSA)'e indirgenir (Şekil 2.5). Yoğunlaşan renk, şeker konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda maksimum absorbansı ölçülür (Wang, 2010).



Şekil 2.5. Artan şeker konsantrasyonunun renk yoğunluğuna etkisi (Luo ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır, 2019).

Glukoz da bir indirgeyici şekerdir. Sahip olduğu serbest aldehit grupları nedeniyle elektron kazanarak bir indirgeyici ajan görevi yapar. 3,5-dinitrosalisilik asit molekülünde nitro gruplarından biri 3-amino-5-nitrosalisilik asite indirgenir ve ardından substratlardaki aldehit gruplarının karboksilik asitlere oksidasyonu gerçekleşir. Dehidrojenasyon reaksiyonu yoluyla glukoz, glukonik asit molekülüne dönüştürülür (Deshavath ve ark. 2020) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. DNS yönteminin etki mekanizması (Dessalegn, 2015).

2.11. Mutasyon

Mutasyon bir organizmanın, virüsün veya kromozom dışı DNA'nın genomunun nükleik asit dizisindeki bir değişimdir (Anonim, 2024e). Canlı bir organizmanın veya bir virüsün bir hücresinin genetik materyalinde (genomunda) çok ya da az kalıcı olabilen ve virüs veya hücrenin neslinin devamında aktarılabilen bir değişikliktir. Bu değişiklikler somatik hücrelerde veya gamet hücrelerinde meydana gelebilir. Çok hücreli bir organizmanın bir vücut hücresi DNA'sındaki mutasyon (somatik mutasyon), DNA replikasyonu yoluyla sonraki neslin hücrelerine aktarılabilir ve dolayısıyla bir hücre bölgesinin anormal fonksiyona sahip olmasına neden olabilir, buna örnek olarak kanser verilebilir. Germinal mutasyonlar, yani yumurta veya sperm hücresindeki mutasyonlar, o bireylerden meydana gelen yavru bireyin mutasyonu taşıyan hücrelere sahip olmasına, kistik fibrosiz gibi rahatsızlıklara sahip olmasına sebep olabilir.

Genom bir ila birkaç uzun DNA molekülünden oluşur ve mutasyon oluşma potansiyeli, bu moleküllerin herhangi bir yerinde herhangi bir zamanda meydana gelebilir. En önemli ve ciddi değişiklikler DNA'nın işlevsel birimleri genlerde meydana gelir. Bir genin mutasyona uğramış formu mutant-alel adını alır. Bir gen tipik olarak, genin transkripsiyonunu uygun zamanlarda açıp kapatmaktan sorumlu olan bir düzenleyici bölgeden ve fonksiyonel bir molekülün yapısına ilişkin genetik kodu taşıyan bir kodlama bölgesinden oluşur. Bir protein genellikle birkaç yüz amino asitten oluşan bir zincirdir. Her amino asit, DNA'daki dört olası baz çiftinden üçünün, benzeri olmayan bir dizisi veya tarafından kodlanır. Dolayısıyla DNA dizisini değiştiren bir mutasyon, amino asit dizisini değiştirebilir ve bu şekilde bir proteinin fonksiyonunu azaltabilir ya da tamamen etkisiz hale getirebilir (Griffiths, 2004). Normal bir insan hücresinde replikasyon sırasında meydana gelen hata oranı yaklaşık 10^{-10} olup, hata okuma (proofreading) mekanizmasının varlığına rağmen görülen hata oranı ise 10^{-8}'dir. DNA yapısını veya dizisini doğal olarak ya da insan yoluyla (fiziksel veya kimyasal) değiştirebilen etkenler vardır ki, bunlara mutajen denir (Debeleç-Bütüner ve Kantarcı, 2006).

Fiziksel mutajen çoğunlukla gama ışınları, X ışınları, iyonize olmayan bir radyasyon olan UV ışınlarıdır. Bu mutajenler, DNA'da hasar oluşturan, mutasyonları indükleyen ve hatta tümör gelişimine sebep olabilen güçlü genotoksik etkilere sahiptir. Radyasyonun neden olduğu birincil hasar rastgele meydana gelir. Bu hasar hem fizyolojik hem de genetiktir. Hasar görmemiş moleküllerin metabolik süreçleri devralması ve DNA onarım mekanizmalarının devreye girmesi sayesinde, DNA'nın fizyolojik olarak iyileşmesi ve onarımı bir dereceye kadar mümkündür.

Kimyasal mutajenler, baz analogları (örneğin 2- aminopürinler), DNA yapısında amino gruplarının kaybına neden olan ajanlar, hidroksil aminler gibi deaminasyon yapan ajanlar, Bazların yapısını ve eşleşme özelliklerini değiştiren kimyasallar, DNA yapısına alkil grubu takan alkilleyici ajanlar, demetilasyon yapan ajanlardır.

Baz analogları DNA replikasyonunda hataya ve yanlış eşleşmeye sebep olarak GC → AT veya AT → GC çift yönlü transisyon mutasyonuna yol açar. Deaminasyon ajanları, benzer şekilde A, C ve G'in deaminasyonuna neden olarak yeni iplikte birtakım mutasyonlara sebep olur. Nitröz asit, deaminasyon ile C→U, meC→ T, A→hipoksantine dönüşümüne ve transisyon mutasyonuna neden olur. Metilleyici ajanlar da çok güçlü mutajenlerdir; özellikle guanin alkilasyonu ile C ve G'in alkilasyonuna ve metilasyonuna yol açar. Etidyum bromür gibi mutajenler, iki baz çifti arasında interkalasyonlara sebep olur ve bu da çerçeve kayması mutasyonu ve mikro delesyonlar ile sonuçlanabilir. Kimyasal mutajenler, mutasyon sıklığı artırıp azaltmada kolay uyarlanabilir özelliktedir. Bu mutajenler aynı zamanda, çeşitli araştırmalarda enzim üreticisi bakteriler üzerinde kullanılarak enzim aktivitesini geliştirmek amacıyla kullanılmıştır (Debeleç-Bütüner ve Kantarcı, 2006; Bhatia ve ark. 2023).

Mutasyonların çeşitli türleri vardır. Nokta mutasyonları ve kromozomal mutasyonlar şeklinde karşımıza çıkabilir. Genler içindeki değişiklikleri kapsayan mutasyon türü nokta mutasyonlarıdır. En basit türleri, baz çifti değişimi olarak adlandırılan tek baz çiftlerindeki değişikliklerdir. Transisyonel (Transition/pürin-pürin yada pirimidin-pirimidin) ve transversiyonel (transvertion/pürin-pirimidin veya pirimidin-pürin) olmak

üzere iki türü vardır. Bir genin protein kodlayan bölgelerindeki baz değişikliği mutasyonunun yol açacağı sonuçlar, genin konumuna ve gelen baza göre değişir. Bu değişikliklerin çoğu, kodlanan proteinde karşılık gelen pozisyonda yanlış bir amino asidin yerini alır ve genellikle protein fonksiyonunun değişmesi ile sonuçlanır. Gelen baz, bazen protein dizisine yeni bir aminoasit girişimine sebep olmaz ve bu şekilde "sessiz" kalabilir. Başka bir senaryoda bazdaki yer değişimi, bir aminoasit kodonunu sonlanma kodonuna dönüştürebilir. Bu durumda zincir erken sonlanabilir ve olması gerekenden daha kısa bir protein oluşturur ki bu mutasyona anlamsız, yani "nonsense" mutasyon adı verilir. Bir diğer mutasyon türü, genin bir ucundan diğerine doğrusal bir şekilde okunan üçlü kodonların, okuma esnasında kayması yüzünden oluşan "çerçeve kayması/ frameshift" mutasyonudur. Bu mutasyon sonucu amino asitler fonksiyonsuz bir yapı kazanır (Griffiths, 2004; Debeleç-Bütüner ve Kantarcı, 2006).

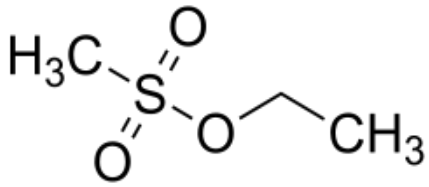
Mutasyonlar iki temel yöntemle gerçekleşebilir: Rastgele mutagenez ve Bölgeye yönelik mutagenez. Rastgele mutagenez, mutasyonların rastgele yapılası işlemidir. Daha sonra bir seçim yöntemi kullanılarak mutasyona uğramış organizmalar seçilerek kullanılır ve bu süreç tamamen rastgeledir. Bölgeye yönelik mutagenez ise, mutasyonların DNA'daki belirli konumlara veya hedef aminoasitlerin alana özgü bir şekilde uygulanmasıdır. Bölgeye yönelik mutasyonların özgüllüğü çok yüksek olsa da, rastgele mutasyon için özgüllük söz konusu değildir (Kumari, 2018).

Bazen bölgeye özgü veya yönlendirilmiş mutajenez olarak da adlandırılan mutajenez, DNA'yı rastgele değiştirmek için mutajenik bileşikler kullanılan mutajenezin aksine, belirli bir konumdaki genin nükleotid dizisini değiştiren bir yöntemdir (Walker ve King, 2023). Alana yönelik mutajenez, nokta mutasyonları oluşturmak için baz analoglarının kullanıldığı daha spesifik bir mutasyonu oluşturma sürecini kapsar. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kavramının ortaya çıkmasıyla birlikte, günümüzde mutajenik oligonükleotidler kullanılarak bölgeye yönelik mutajenez uygulaması yapılmaktadır.
Rastgele mutajenez, organizmaların rastgele bir şekilde mutasyonlara uğraması sürecini ifade eder ve bu nedenle spesifik değildir. Bu mutasyon işlemi, organizmanın belirli bir süre boyunca mutajene maruz bırakılmasını ve sonrasında mutantların seçilmesini kapsar.

Mutajenler UV radyasyonu, Etil metan-sülfonat gibi mutajenler ya da alkilleyici ajanlar olabilir. Bu yöntem mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hatta hayvanlarda mutant eldesi için en uygun yöntem olarak kullanılmaktadır (Kumari, 2018). Rastgele mutajenez enzimlerin, proteinlerin, hatta istenen veya geliştirilmiş özelliklere sahip tüm genomların üretilmesi için güçlü bir yöntemdir (Labrou, 2010). Rastgele ve kapsamlı gerçekleştirilen mutajenez, çok sayıda mutasyon istendiğinde yararlı bir yaklaşımdır; ancak sonuçta ortaya çıkan değişiklikler üzerinde daha az kontrolü sağlar. Bu mutajenez farklı yollarla gerçekleştirilebilir: Eşleşmeyen bazlarla rastgele üretilen primerler, belirsiz baz analoglarının kullanımı, hatalı PCR, mutajenik ajanların kullanımı ve belirsiz baz analogları kullanımı gibi yöntemler rastgele mutajenezi sağlar. Rastgele mutajenez, bir hedef gen dizisine nükleotidlerin eklenmesi veya diziden silinmesi halinde meydana gelebilir (Durland ve Ahmadian-Moghadam, 2022). Bitki materyallerine fiziksel ve kimyasal mutajenlerin uygulanması ile gelişen *in vivo* ve *in vitro* rastgele mutajenez, mutasyon sayısını yapay olarak artırarak çeşitli bitkilerin ıslahı için kullanılabilmektedir (Mullins ve ark. 2021).

2.11.1. EMS (Etil metansülfonat) Mutagenezi

Etil metansülfonat (EMS), $CH_3SO_3C_2H_5$ formülüne sahip mutajenik, teratojenik ve kanserojen bir maddedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. EMS kimyasal yapısı (Anonim, 2014).

Etil metansülfonat (EMS), baz değişiklikleri ve nükleotid mutasyonları yaratan aktif alkil grubunun eklenmesi yoluyla nükleotidlerin kimyasal modifikasyonunu indükleyebilen, yaygın kullanılan mutajenlerden biridir. DNA onarımına ilişkin çalışmalarda model alkilleyici ajan olarak kullanılmıştır (Amini, 2014; Chen ve ark. 2023)

Kimyasal bir mutajen olan EMS'nin kullanımı, diğer yöntemlerle kıyaslandığında kolaydır ve çok yüksek mutasyon aralığı sağlayabilmekte olup günümüzde çok yaygındır. Radyolojik yöntemlerle karşılaştırıldığında kimyasal mutajenler translokasyon ve delesyonlardan ziyade, tek baz çifti değişikliklerine veya daha yaygın bilinen adıyla, tek nükleotid polimorfizmlerine (SNP'ler) neden olma eğilimi göstermektedir (Sikora ve ark. 2011).

Genel olarak bu alkilasyon ajanları, guaninde N7 ve O6, adeninde N3 ve N7'si, timinde N3, O2 ve O4, sitozinde N3, O2 ve N4 dahil olmak üzere nükleotidlerin bazı spesifik bölgelerine ve fosfonat omurgalarına alkil grupları yerleştirerek mutasyonlara neden olur. O2-, N3- ve O4-etiltimidin lezyonları RNA polimeraz II tarafından tanınabilir ve atlanabilir.

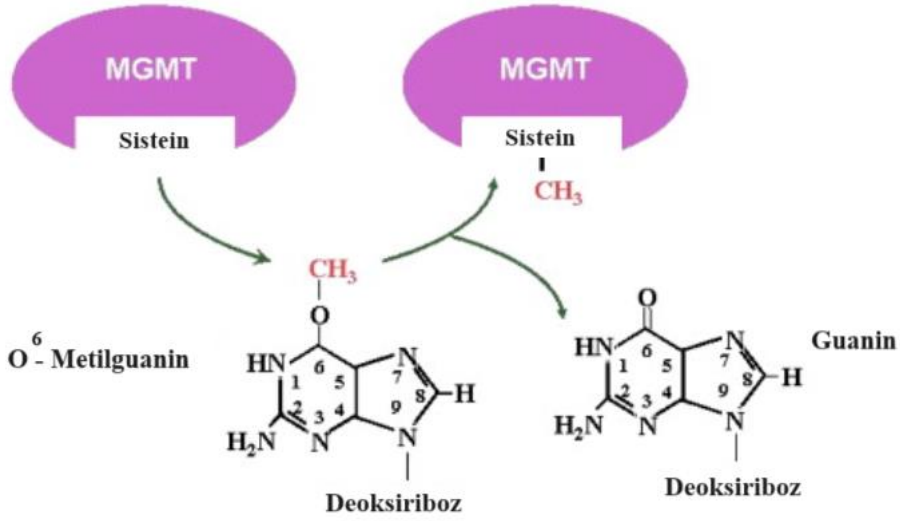
EMS'nin etil grubu, DNA'daki guanin ile reaksiyona girerek anormal baz O6 - etilguanin'i oluşturur. O6-guanin alkilasyonuna sahip guanin, timin ile eşleşebilirken sitozin ile eşleşemez, bu da daha sonraki DNA onarımında G/C çiftinin A/T ile değiştirilmesine neden olur. Yapılan çalışmalar EMS'nin neden olduğu varyasyonların %99'undan fazlasının G/C'den A/T'ye geçişler olduğunu göstermiştir. Farklı türlerde EMS tarafından indüklenen G/C'den A/T'ye değişimin farklılık gösteren yüzdeleri, organizmaların genomik özellikleriyle ilişkili olabileceği açıklanmıştır (Yan ve ark. 2021). Timinde ise 4 numaralı keto gruplarını alkiller. Alkillenmiş timin ise guanin ile eşleşme yapar ve transisyona neden olur (Bostancı, 2014).

EMS bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde, böceklerde ve insan hücreleri de dahil olmak üzere memelilerde mutajeniteyi indükleyen tek fonksiyonlu bir ajandır (Greim, 2023). Organizmalardaki belirli özelliklerin moleküler temelini anlamak, kullanılmayan genleri tanımlayabilmek ve genlerin işlev karakterizasyonunu yapabilmek adına genetik kaynakların oluşturulabilmesi için EMS mutagenezi önemli bir araçtır. Farklı türlerde kimyasal mutajenez, farklı oranda nükleotid değişimine neden olur. İleri genetik taramalarda EMS mutajenin kullanımının getireceği faydalar, çeşitli organizma türlerindeki etkinliğine bağlıdır (Shamshad ve ark. 2023). Bu kimyasal mutajen ile

bakteriyel suşların genetik manüplasyonu sağlanarak istenilen özelliklere sahip üstün mutantlar elde edilebilmektedir (Lakhssassi, 2020). Glikoz oksidaz aktivitesini, pektinaz, lipaz, fitaz, katalaz gibi enzimler ve sitrik asit üretimini artırmak için belli başlı mikroorganizmalarla çalışılmıştır. Söz konusu mutajen ile yapılan çalışmalarda EMS mutantı suşun ana suştan 1.4'ten 2 kata kadar fazla enzim ürettiği bildirilmiştir (Ribeiro, 2013).

2.11.2. EMS Mutasyonu Tamir Mekanizması

DNA hasarına endojen (insersiyon, delesyon, metilasyon vb.) ve eksojen ajanlar (alkilleyici ajanlar, UV, iyonize radyasyon vb.) sebep olmaktadır. Endojen ve eksojen kaynaklı hasarlarda, hasarın yoğunluğuna bağlı olarak hücrelerde gen ifadesi değişimi, yaşlanma, apoptoz ve kanser gibi olaylar meydana gelmektedir. Bu yüzden hücreler genomik bütünlüğü korumak için çeşitli onarım mekanizmaları geliştirmek zorundadır.
DNA'daki nükleotitlere alkilleyici ajanların bağlanmasıyla DNA'da yapı ve işlev bozukluğu görülür. Bu bağlanmanın en mutajenik hasara sebep olduğu pozisyon guanin bazının O6 pozisyonudur. O6-metilguanin (O6-meG), RNA polimeraz II'nin transkripsiyon esnasında uzatma görevini kısmi olarak bloke etmektedir. Tamir edilmediği taktirde hücrenin ilk replikasyonunun sonunda O6-MeG'in karşısına tamamlayıcı baz olarak timin bazı geçer Hücrelerde bulunup eksprese edilen MGMT (O6-metilguanin-DNA-metiltransferaz) enzimi, bu hasarın giderilmesi için bir gereklidir. MGMT, DNA'da konumlanmış alkil grubunu kendi üzerindeki sisteine transfer ederek alkilasyonun mutajenik etkisini ortadan kaldırıp doğrudan bir onarım sağlamaktadır (Şekil 2.8). Alkillenen MGMT geri dönüşümü olmaksızın inaktive olarak ubikitin molekülleri ile işaretlenir ve degredasyona uğrar (Şen ve ark. 2017; Kurtoğlu ve Tekedereli, 2015).



Şekil 2.8. O6- metilguanin-DNA metiltransferaz molekülünün onarım mekanizması (Silber ve ark. 2012).

O6- metilguanin-DNA metiltransferaz, DNA "intihar" onarım enzimi olarak da bilinmektedir. MGMT geni 10q26.3 kromozomunda yer alır ve genin ekspresyonu epigenetik olarak düzenlenebilir. MGMT'nin, glioblastoma gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda ve onkolitik virüslerde etkinliğinin değerlendirildiği çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Yi ve ark. 2019).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada Türkiye topraklarından selülaz üreten *Bacillus* türlerinin taranması sonucu Denizli toprağından izole edilen ve *Bacillus subtilis* 171ES (GenBank accession number OM004561) olarak adlandırılmış selülaz üretme potansiyeli yüksek bakteri, kimyasal mutasyona uğratılmak üzere ana bakteri olarak kullanılmıştır (Msakni ve ark. 2020)

3.2. Yöntem

3.2.1. Kimyasal mutajen EMS (Etil Metansülfonat) ile mutasyon çalışması ve selülaz enziminin kalitatif tayini

Rastgele mutajenez yönteminde önemli bir kimyasal mutajen olan Etil Metansülfonat (EMS, Sigma M-0880) 50- 500 µg/mL arasında ve 4-400 mg/mL arasındaki konsantrasyonlarda kullanılmıştır. EMS'ye göre letal (ölüm) oranı aşağıda verilen denklem ile saptanmıştır (Zong ve ark. 2012).

% Ölüm oranı: K-M/ K x 100

Burada; K: EMS uygulanmayan petride gözlenen toplam koloni sayısı,

M: EMS uygulandıktan sonra petride gözlenen toplam koloni sayısını göstermektedir.

Bakterinin gecelik kültürü, 30 mL Nütrient Broth (NB) besi ortamı içeren erlenlere %1 aşılama yapılmış, bu esnada EMS mutajeni besi ortamına eklenmiştir. Bakteriler, EMS içeren besi ortamında 37°C sıcaklıkta, 150 rpm çalkalama hızında 18 saat inkübasyona bırakılmış, her iki saatte bir yaklaşık 2 mL olmak üzere bakteri örnekleri alınmıştır. Üretim sonunda alınan örnekler, 6000 rpm'de 10 dakika olacak şekilde santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve bakteri hücrelerini içeren pellet, EMS'nin uzaklaştırılması için 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 6.5) ile yıkanmıştır. Yıkanan pelletler

aynı koşullarda tekrar santrifüjlenmiş ve tampon uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelletten %0.85'lik steril FTS çözeltisi ile uygun dilüsyonlar yapılmıştır. Dilüsyon sonrası bakteriler, selülaz aktivitesinin kalitatif olarak belirlenmesi için karboksil metil selüloz (CMC) içeren katı ortam kullanılmıştır. Ortam içeriğinde litrede; 10g tripton, 5g maya özütü, 10g NaCl, 1g CMC ve 15g agar (pH 7.0) bulunmaktadır (Kılıçer 2014). CMC içeren katı ortama drigalski ile ekimi yapıldıktan sonra, petriler 37°C sıcaklıkta 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda petri yüzeyleri %0.1'lik hazırlanmış kongo kırmızısı ile 15-20 dakika süreyle boyanmış ve daha sonra boya dökülerek petri yüzeyi 1M NaCI çözeltisi ile yıkanmıştır. Ortaya çıkan sarı hidroliz zonları cetvel yardımıyla mm cinsinden ölçülerek, ana bakteriye göre en geniş selülaz zonları oluşturan 4 adet mutant seçilmiş ve daha sonra kullanılmak üzere Nütrient agarlı (NA) ortamda +4°C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca uzun süreli depolama için gliserol stokta -20°C'de muhafaza edilmiştir. Enzimatik indeks (EI), aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır (Florencio ve ark. 2012).

$$E.I = \frac{\text{Hidrolitik zon çapı}}{\text{Koloni çapı}}$$

Her bir deneme için 3 paralel çalışma yapılmıştır.

3.2.2. Mutant bakterilerden selülaz üretim koşulları

Çalışmada selülazın enzim aktivitesini kantitatif olarak belirlenmesinde 4 adet mutant bakteri kullanılarak Msanki (2020) tarafından oluşturulan yeni modifiye bir üretimleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Mutant bakteriden selülaz enzimi üretimi için kullanılan modifiye besi ortamı.

İçerik	%g
Yağsız Süt Tozu (Skim milk powder)	1.6
Maltoz	1
$LiSO_4$	0.03
K_2HPO_4	0.2
pH	7.0

Kültürün saklandığı ortam olan NA'lı ortamdan steril öze yardımıyla alınan mutant bakteri kültürleri, 30 mL NB içeren 100 mL'lik erlenlere aşılanmış, 37°C' de 150 rpm çalkalama hızında ayarlanan inkübatörde 18 saat boyunca ön inkübasyona bırakılmıştır. Bakterinin enzim üretim kapasitesinin saptanması amacıyla 18 saatin sonunda alınan bakteri kültürlerinin spektrofotometre (Beckman Coulter- DU 700) kullanılarak, 600 nm'deki optik yoğunlukları (O.D) ölçülmüş bir standart oluşturmak için steril fizyolojik tuzlu su ile OD dğerleri 0.3'e ayarlanmıştır. Ayarlanan kültür çözeltilerinden, içerisinde 150 mL enzim üretim besi yeri içeren 500 mL kapasiteli erlenlere %1 olacak şekilde aşılanarak 37°C sıcaklıkta 150 rpm çalkalama hızına ayarlı inkübatörde 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 16., 24., 40., 48., 64. ve 72. saatlerde alınan örneklerle bakterinin üreme ve enzim aktivite tayinleri yapılarak mutant bakterilerin gelişim grafiği çıkartılmış ve maksimum enzimin üretildiği saat saptanmıştır. Ana bakteriye göre en verimli bir adet mutant bakteri seçilmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2.3. Bakteri üremesinin ölçülmesi ve enzim aktivitesinin ölçülmesi

Bakteri üremesinin saptanması amacıyla, besi ortamındaki bulanıklık spektrofotometre ile ölçülmüştür. 3.2.2'de belirtildiği gibi inkübasyona bırakılan besi yerlerinden belirli saatlerde örnekler alınıp 600 nm dalga boyunda okunmuştur. Selülaz enzimi üretimi için kullanılan besi ortamı öncesinde saklanıp kör olarak kullanılmış ve optik yoğunluk (OD) değerleri spektrofotometrede okunarak bakterinin üreme miktarı saptanmıştır (Sarıkaya, 1995). Elde edilen OD değerleri zamana karşı grafiklenmiş ve bu şekilde bakteri üreme eğrisi oluşturulmuştur.

Selülaz enziminin aktivite tayininde Miller'in (1959) kullandığı yöntemden yararlanılmıştır. Bunun için, ilk olarak belirlenen saatlerde kültür ortamından yaklaşık olarak 10 ml örnek alınarak 15 dakika boyunca +4ºC ve 5000 rpmde santrifüjlenmiş ve enzim içeren üst sıvı kısım ile bakteri hücrelerinin bulunduğu pellet kısmı birbirinden ayrılmıştır. Buradan alınan sıvı kısım süpernatant olup ham enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır. Enzimin aktivite tayininde substrat olarak %1 oranında karboksil metil selüloz (CMC) kullanılmıştır (CMC,

50 mM sodyum fosfat (pH 6.5) tamponunda çözdürülerek hazırlanmıştır). Bu çözelti her aktivite tayin işlemi öncesinde taze olarak hazırlanmalıdır.

Selülaz aktivite tayini basamakları çizelge 3.2'de özetlenmiştir. Aktivite tayini deneylerinde 1'er adet olmak üzere kör tüpü ve enzim için örnek tüpü kullanılmıştır. Örnek tüpüne önce %1 oranında hazırlanmış CMC substrat çözeltisinden 0,5 mL, kör tüpüne ise DNS çözeltisinden 0,5 mL eklenmiş ve tüpler 37°C sıcaklığa ayarlanmış olan su banyosunda 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon sıcaklığına ulaştırılmıştır. Substrat içeren tüplere 0.5 mL enzim çözeltisi, kör tüpe 0,5 mL pH 6.5 ayarlı sodyum fosfat tamponu ilave edilmiş ve vorteksle iyice homojenize edilerek 37°C'de 30 dakika süreyle su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda reaksiyonu durdurmak için enzim-substrat karışımı içeren tüpe 1 mL Dinitrosalisilik asit (DNS) (1g DNS tartılarak 20 mL 2N NaOH içerisinde ve 30g Na-K-Tartarat ise 50 mL distile su içerisinde çözdürülmüş, sonrasında bu iki çözelti bek alevi üzerinde homojen hale gelene kadar karıştırılmış ve en son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır (Garriga ve ark. 2017)) eklenip, suda 5 dakika kaynatılmış ve sonrasında soğuması beklenmiştir. Örneklerin absorbansları spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda köre karşı okunmuştur.

Çizelge 3.2. Selülaz aktivite tayini basamakları

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek Tüpü	Kontrol (Kör) Tüpü
Substrat çözeltisi	0,5 mL	-
DNS	-	1
Su banyosunda 37 ºC'de 5 dakika bekletilir.		
Enzim çözeltisi	0,5 mL	-
50mM Na-fosfat Tamponu (pH 6.5)	-	0,5 mL
Vorteks kullanarak karıştırılır ve 37 ºC su banyosunda 30 dakika süreyle bekletilir.		
DNS	1 mL	-
Substrat çözeltisi	-	0,5 mL
Vorteks ile karıştırılır ve tüpler 5 dakika kaynatılır		
Tüpler soğutulur		
Örnek, köre karşı OD540 nm dalga boyunda okunmuştur.		

Deneysel koşullar altında, 1 dakikada 1 µmol glukozu açığa çıkaran enzim miktarı bir ünite (U) enzim aktivitesi olarak tanımlanmıştır. Glukoz standart eğrisi, glukozun farklı konsantrasyonlarda hazırlanmasından sonra DNS metodu uygulanmış ve daha sonra 540 nm'de absorbanslarının okunmasıyla elde edilmiştir.

Enzim aktivitesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır (Roopa ve ark. 2017):

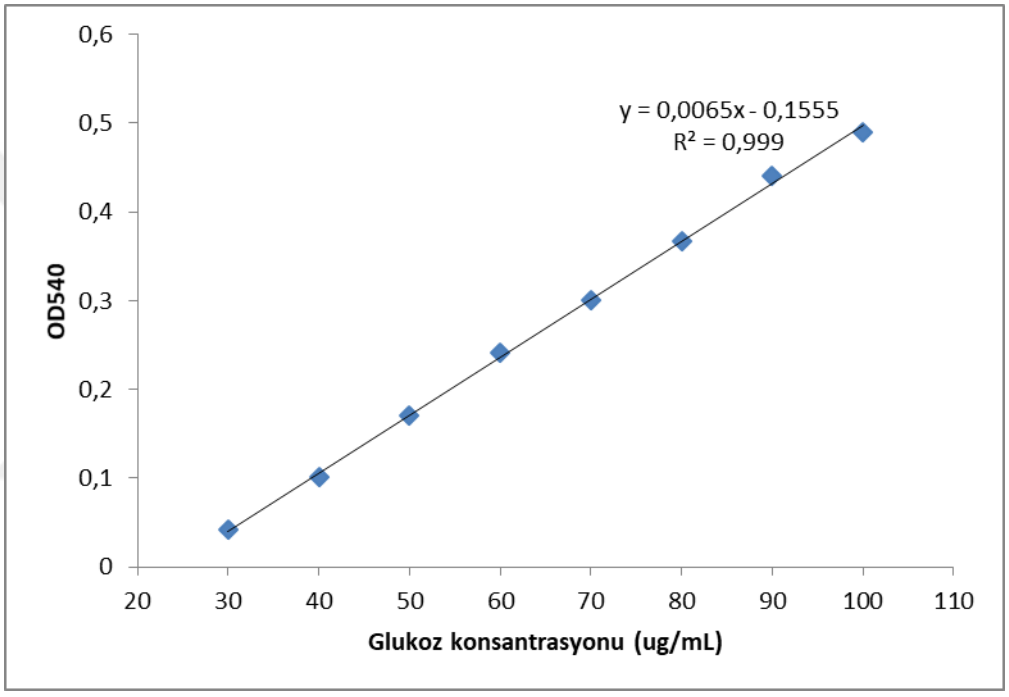
$$U/mL = \frac{\text{Serbestleşen Glukoz}}{\text{Süre (30 } dk)x \text{ Kullanılan Enzim Hacmi (0,5 mL)}} x\ Dilüsyon\ Faktörü\ (varsa)$$

3.2.4. Glukoz standart eğrisi grafiği ve hazırlanması

Enzim aktivitesini hesaplamak için, 0-100 µg/mL konsantrasyon aralığında glukoz çözeltileri hazırlanarak standart bir eğri oluşturulmuştur. Bu eğri üzerinden,

konsantrasyon ile absorbans değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren bir grafik çizilmiş ve lineer regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bilinmeyen bir örneğin glukoz konsantrasyonu, elde edilen doğru denklemi kullanılarak standart grafikten hesaplanmıştır (Şekil 3.1).

Doğru denklemi y= 0,0065x- 0,1555 ve Regresyon katsayısı $\mathbf{R^2 = 0.999'dir.}$



Şekil 3. 1. Glukoz standart grafiği

3.2.5. Selülaz üretimi üzerine bazı tarımsal atıkların etkisi

Bakterilerin üreme kapasiteleri ve enzim üretimi üzerine etkileri saptanmak üzere besi ortamında bazı farklı tarımsal atıklar denenmiştir. Bu amaçla enzim üretimi için kullanılan besi ortamındaki CMC yerine aynı miktarda (%1) bahçe samanı, buğday samanı, yabani ot samanı, mısır koçanı, buğday kepeği, pamuk atıkları, talaş, ofis atık kâğıdı, patates kabuğu, domates kabuğu, muz kabuğu, soğan kabuğu, bezelye kabuğu, havuç kalıntıları, elma posası ve portakal kabuğu gibi tarımsal, sebze ve meyve atıkları kullanılarak etkileri araştırılmıştır. Bakterinin üretimi 3.2.2'de belirtildiği şekilde

yapılmıştır. Bakteri, daha önce maksimum enzim üretiminin saptanmış olduğu saate kadar üretilmiş olup, o saatte bakterinin üremesi ve enzimin aktivite tayini spektrofotometrik olarak yapılmıştır.

Çalışmada her bir deney 3 kez tekrarlanmış, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler gösterilmiştir.

3.2.6. Selülaz enziminin kısmi saflaştırılması

Mutant *Bacillus* suşundan elde edilen selülaz enzimi kısmi olarak saflaştırılıp ardından karakterize edilmiştir. Karakterizasyon amacı ile mutant bakteri, besi ortamında maksimum enzim üretiminin belirlendiği saate kadar üretilmiş ve kültür ortamı, 6000 rpm'de 15 dakika +4°C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere peletten ayrılmıştır.

Ham mutant enzimi kısmi olarak üç basamakta saflaştırılmıştır. Her bir basamak sonrası protein ve enzim aktivite tayinleri yapılmak üzere ayrılmıştır. Protein tayini, standart olarak kullanılan "Sığır Serum Albumin"i ile Lowry ve ark. (1951) metoduna göre yapılmıştır.

Amonyum sülfat çöktürmesi;

Ham enzime uygulanacak olan amonyum sülfat çöktürmesi, Msakni (2020) tarafından maksimum verim alınan konsantrasyon olarak saptanan %60'lık amonyum sülfat ile gerçekleştirilmiştir.

Amonyum sülfat önce bir havana alınarak toz haline getirilmiştir. Ham enzim çözeltisi içeren beher, buz dolu bir kaba alınmış ve üzerine spatül ucu ile yavaş bir şekilde amonyum sülfat eklenmiştir. Bu işlem manyetik karıştırıcı üzerinde gerçekleştirilerek amonyum sülfatın çözünmesi sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan örnek, manyetik karıştırıcıda sürekli karıştırılmak suretiyle bir gece +4°C'de bekletilmiştir. Çöktürme

sonrasında oluşan enzim-tuz karışımı 10.000 rpm'de 30 dk süreyle santrifüjlenmiş, pellet diyaliz işleminde kullanılmak üzere süpernatanttan ayrılmıştır.

Diyaliz;

Çöktürme işlemi sonunda santrifüjden elde edilen pellet 50 mM sodyum fosfat (pH 6.5) tamponunda çözülmüştür. Yarı geçirgen bir membrana sahip diyaliz tüpü (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da, 25 mm x 16mm) belirli uzunlukta kesilmiştir. Kesilen diyaliz tüpü, gözeneklerinin temizlenmesi ve kullanılacak kadar yumuşak hale gelebilmesi için, işlemden bir gün önce 50 mM sodyum fosfat tamponuna alınmıştır. Yumuşayan diyaliz tüpünün bir ucu ip ile sıkı olacak şekilde bağlanmış ve tampon içinde çözdürülen pellet, tüpe aktarılarak diğer ucu da ip yardımıyla sıkıca bağlanmıştır. Diyaliz tüpü, yaklaşık 1litre 50 mM sodyum fosfat (pH 6.5) tampon içeren behere alınmış ve beherin içine balık atılarak karışımın sürekli olması sağlanmıştır. Diyaliz işlemi, çöktürme işleminde olduğu gibi manyetik karıştırıcı üzerinde +4°C'de gerçekleştirilmiştir. İşlem süresince tampon birkaç kez değiştirilmiş, bu sayede tuzun iyice giderilmesi sağlanmıştır. Diyalizat, protein ve aktivite tayinleri yapılmak üzere ayrılmıştır.

Diyalizatın ultrafiltrasyon yöntemi ile konsantrasyonu;

Diyalizat, ultrafiltrasyon (MW cut-off 30,000) tüpüne alınarak +4°C soğutmalı santrifüjde 5000 rpm hızında 15-20 dakika süreyle istenilen hacim elde edilene kadar santrifüj edilerek konsantrasyonu sağlanmıştır. Konsantre edilen örneğin protein ve aktivite tayinleri yapılmıştır.

3.2.7. Protein miktarının belirlenmesi

Saflaştırma basamaklarının her birinden alınan örneklerdeki protein miktarlarının hsaplanması için Lowry Metodu kullanılmıştır (Lowry 1951). Protein standart grafiğinin oluşturulması için BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılmış, 5 g BSA 10 mL distile suda çözülmüş ve 0-500 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanarak 546 nm'de absorbansları ölçülmüştür (Beckman Coulter-UD 700).

Ayıraç A: %3 oranında hazırlanan Na_2CO_3 (0.1 N NaOH içinde çözdürülmüş)

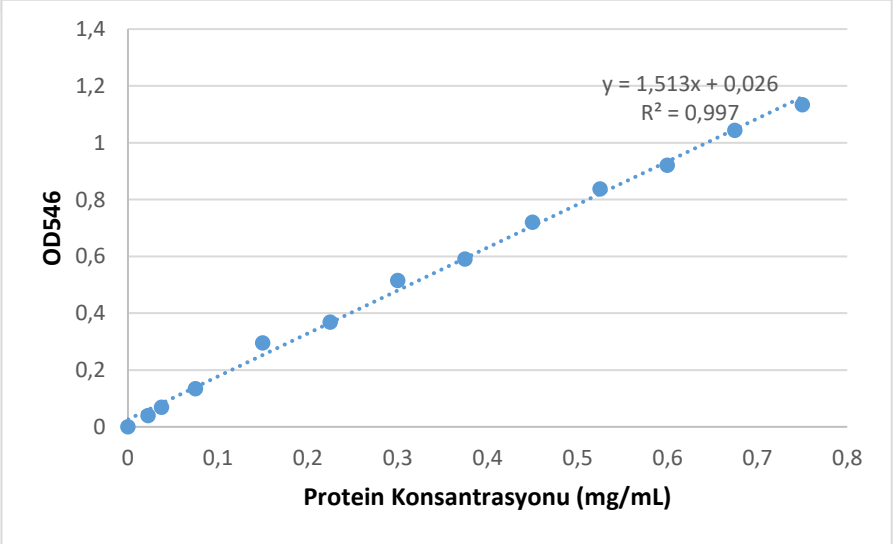
Ayıraç B: %1 oranında hazırlanan $CuSO_4$ (%1' lik K-Na-tartarat içinde çözdürülmüş)

Ayıraç C: %2 oranında hazırlanan K-Na-tartarat

Ayıraç D: A, B ve C ayıraçları kullanılarak, günlük olarak taze hazırlanır (25:1:1 oranında).

Ayıraç E: Folin- Fenol Ayıracı (1:1 oranında seyreltilmiş olarak)

Örnek çözeltiden 1 mL alınarak, üzerine D ayıracı 5 mL eklendikten sonra vorteks ile karıştırılmıştır. Vorteks sonrası karışım 10 dakika karanlıkta bırakılmıştır. Kör çözeltisi için 5 mL D ayıracı ve 1 mL distile su kullanılarak aynı işlemler tekrarlanmıştır. 10 dakikanın sonunda, örneklere 0,5'er mL E ayıracından eklenerek vorteks ile karıştırıldıktan sonra 20 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Sürenin sonunda örneklerin absorbansları köre karşı 546 nm'de okunarak sonuçlar alınmıştır. Alınan absorbans değerleri standart protein konsantrasyonlarına karşı grafiğe aktarılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. Protein standart grafiği

3.2.8. Selülaz enzimin karakterize edilmesi

Selülaz enzimi kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra, enzimin karakterizasyonu amacıyla sıcaklık, pH ve potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Bunun yanı sıra ham enzimin moleküler ağırlığı ile kinetik özellikleri (V_{max} ve K_m) de saptanmıştır.

Çalışmada her bir deney 3 kez tekrarlanmış, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler gösterilmiştir.

3.2.9. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Kısmi saflaştırılan enzim aktivitesine sıcaklık parametresinin etkisini araştırmak amacı ile sıcaklık değerleri 35, 37 (Kontrol), 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 80 ^oC olarak alınmış ve optimum sıcaklık değeri saptanmıştır. Enzimin sıcaklık stabilitesini saptamak amacıyla optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinde belirli sürelerde inkübasyona bırakılmış ve aktiviteleri saptanmıştır. Her bir sürede alınan aktivite değerleri, standart olarak kullanılan 37^oC sıcaklıktan alınan değer %100 kabul edilip kıyaslanarak % bağıl aktivite şeklinde hesaplanmıştır.

3.2.10. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Mutant enzimin aktivitesinin üzerine farklı pH değerlerinin etkilerini saptamak amacıyla pH 2,0 ve 3,0 aralığı için 0.1 M glisin-HCl, pH 4,0-6,0 için 0,1 M sodyum asetat, pH 7,0-8,0 için 0.1 M Tris-HCl ve son olarak pH 9,0-10,0 aralığı için 0,1 M glisin-NaOH kullanılarak pH 2,0-10,0 değerleri arasında aktiviteleri ölçülerek optimum pH değeri saptanmıştır. Ölçümü yapılacak her pH değerinde elde edilen aktivite değerleri, kontrol olarak kullanılan pH 6,5'da elde edilen değer %100 kabul edilip kıyaslanarak % bağıl aktivite şeklinde hesaplanmıştır.

3.2.11. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi

Enzim aktivitesinin üzerine tuzların, metal iyonlarının ve redükleyici bileşiklerin etkisini araştırmak için enzim her biri 1 ve 5 mM konsantrasyona sahip olacak şekilde $FeSO_4$, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, NaCl, $LiSO_4$, $CuSO_4$, $BaCl_2$, $CaCl_2$, KCl, EDTA, 2-

merkaptoetanol ve SDS ile inkübe edilmiş ve sonrasında aktivite tayini yapılmıştır. Aktiviteler diğer karakterizasyon basamaklarında olduğu gibi % bağıl aktivite şeklinde hesaplanmıştır.

3.2.12. Kinetik parametrelerin saptanması

Kinetik parametreleri saptanmak için, farklı konsantrasyonlarda CMC hazırlanmış ve enzimin V_{max} ve K_m değerleri Lineweaver–Burk grafiği kullanılarak saptanmıştır.
Çalışmalarda her bir deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler gösterilmiştir.

3.2.13. Selülaz enziminin moleküler ağırlığının tespiti

Enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesinde Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yönteminden yararlanılmıştır (Laemmli 1970).
Kullanılan çözeltiler ve jellerin hazırlanması aşağıda belirtilen şekildedir;

a) Akrilamid çözeltisi (% 30)

Polimer matriksin hazırlanmasında akrilamid ve N,N'-metilen-bisakrilamid kullanılmıştır. Bunun için; 28,8 g akrilamid ve 1,2 g bis akrilamid 100 mL distile suda çözdürülmüştür. Ardından Whatman No:1 filtre kâğıdından geçirilerek kahverengi şişede karanlık bir ortamda saklanmıştır. Hazırlanan çözeltinin 2 ay boyunca kullanım olanağı vardır (Sarıkaya 1995).

b) 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

Bu çözelti, örnek tamponu ve yükleme jelinin hazırlığında kullanılmıştır. Bu amaçla önce 6,05 g Tris Base tartılmış ve 80 mL distile su içinde çözülmüştür. İyice çözünmesi sağlandıktan sonra pH 6.8'e saf HCl kullanılarak ayarlanmış ve son hacmi distile su ile 100 mL olacak şekilde tamamlanmıştır. Son olarak pH değeri kontrol edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

c) 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

Bu çözelti, ayırma jelinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Çözelti hazırlanmasında Öncelikle 18,17 g Tris Base tartılıp 80 mL distile su ile çözülmüştür. Çözündükten sonra pH 8.8' e saf HCl kullanılarak ayarlanmış ve çözeltinin son hacmi distile su ile 100 mL olacak şekilde tamamlanmıştır. Son olarak pH'ı tekrar ölçülerek kontrol edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

d) %10' luk (w/v) Amonyum Persülfat (APS)

Bunun için 10 g APS tartılarak çözelti hacmi 100 mL'ye distile su kullanılarak tamamlanmıştır.

e) %20'lik (w/v) SDS çözeltisi

Bunun için 2 g SDS tartılmış ve öncelikle bir miktar distile su içinde çözdürülmüştür. Çözündükten sonra çözelti hacmi distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

f) Örnek Tamponu

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 mL
%10'luk SDS	4 mL
Gliserol	2 mL
β-merkaptoetanol	1 mL
Bromfenol mavisi	0,01 g
dH_2O	100 mL

%10'luk (w/v) SDS çözeltisinin hazırlanması için 1 g SDS tartılarak bir miktar distile su içinde çözdürülmüş daha sonra son hacmi distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Örnek tamponu alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C'de saklanmıştır.

g) Yürütme (running, elektrot) tamponu

Tampon hazırlığı için 5,76 g glisin ve 1,21 g Tris Base tartılarak 1L distile su içerisinde çözülmüştür. Çözündükten sonra çözeltiye 1 g SDS eklenmiş ve çözünene kadar kısa bir süre daha karıştırılmıştır.

h) Boyama çözeltisi

Jelin boyanması için kullanılan bu çözelti, içerdiği alkol sebebiyle uçma ihtimaline karşı taze hazırlanmıştır. Boyama çözeltisi hazırlığı için Coomassie Brilliant Blue R 0,75 g tartılarak, 125 mL izopropanol içerisinde çözülmüştür. Çözündükten sonra bu karışıma

325 mL distile su ve son olarak 50 mL asetik asit eklenip manyetik karıştırıcıda iyice karıştırılmıştır. Bozunma ihtimaline karşı çözelti karanlık alanda saklanmıştır.

i) Yıkama çözeltisi

Boyama çözeltisinin jelden uzaklaştırılması amacıyla hazırlanan bu çözelti, içeriğindeki alkolün uçma ihtimaline karşı taze olarak hazırlanmıştır.

Yıkama çözeltisi hazırlığında 500 mL distile su, 400 mL izopropanol ve 100 mL asetik asit kullanılmıştır.

j) Yükleme (stacking %3) ve ayırma (separating %10) jeli

Yükleme ve ayırma olarak iki farklı jel hazırlanmıştır (Çizelge 3.3.). Jeller hazırlanırken dikkat edilmesi gereken önemli husus, APS ve TEMED'in jele en son eklenmesidir. APS ve TEMED polimerleşmeye sebep olduğu için jellere eklendikten sonra pipet yardımıyla karıştırılmış, vakit kaybetmeden cam plakalara dökülmüştür.

Çizelge 3.3. SDS-PAGE yöntemi için hazırlanan jellerin içerikleri.

İçerik	**Yükleme Jeli (%3)**	**Ayırma Jeli (%10)**
Tris HCl (0,5M, pH 6.8)	2,5 mL	-
Tris HCl (1,5M, pH 8.8)	-	5 mL
%30'luk (w/v) Akrilamid	1,1 mL	6,8 mL
dH_2O	6,1 mL	8 mL
%20'lik (w/v) SDS	50 µL	100 µL
APS (100 mg/mL)	50 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL

Örnekler hazır hale geldikten sonra, cam plakalar elektroforez (Bio-Rad) mandalına yerleştirilip sızıntıyı engelleyecek şekilde sabitlenmiştir. Önce ayırma jeli, cam plakaların arasına yavaşça dökülmüştür ve bu esnada hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilmiştir. Jelin yüzeyinin dümdüz hale gelebilmesi için üzerine ince bir katman olarak izopropil alkol dökülmüştür. Yaklaşık 30 dakika süren polimerleşmeden sonra alkol, kurutma kağıdı kullanılarak jelden uzaklaştırmıştır. Daha sonra yükleme jeli de aynı şekilde plakaların arasına dökülmüş, polimerleşme gerçekleşmeden elektroforez tarağı jele yerleştirilmiş ve bu aşamada hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilmiştir.

Yükleme jelinin polimerleşmesi yaklaşık 30 dakika içerisinde tamamlandıktan sonra tarak, kuyucukların arasının bozulmamasına özen gösterilerek çıkarılmıştır. Kuyucuklar düzgün şekilde görüldükten sonra elektroforez tankının haznelerine yürütme tamponu eklenmiştir.

Standart olarak, içeriğinde 11 farklı protein bulunan (Cell Signaling Technology Prestained Protein Marker 13953S) belirteç olarak kullanılmıştır. Ham selülaz örneğinden 75 µl ve örnek tamponundan ise 25 µl alınarak ependorf tüplerinde hacim 100 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler kaynar su içerisinde 5 dakika bekletilmiş, daha sonra oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Tankta daha önce hazırlanmış olan jelin ilk kuyucuğuna 5 µl olacak şekilde protein marker, diğer kuyucuklara ise 10 µl örnek konulduktan sonra 150 V akım verilerek elektroforeze başlanmıştır. Yaklaşık 1 saat süren işlem, izleme boyası jelin 1 cm altında kaldığında durdurulmuştur.

Elektroforez işleminden sonra jel, cam plakaları dikkatlice açarak çıkartılmıştır. Yükleme jeli ile ayırma jeli birbirinden ayrılmış ve daha sonra boyama işlemine geçilmiştir. Jel, boyama çözeltisi içinde bir gece 50 rpm'de çalkalanmaya bırakılmıştır. Ertesi gün boyanmış olan jelin yıkanması işlemine geçilmiş ve yıkama çözeltisine alınarak boyanın jelden giderilmesi sağlanmıştır. İşlem 50 rpm'de yaklaşık 3 saat sürmüş ve yıkama çözeltisi bu işlem sırasında birkaç kere değiştirilmiştir. Daha sonra jel, yıkama çözeltisinden çıkartılmış ve standartlar baz alınarak örneklerin molekül ağırlıkları belirlenmiştir.

3.2.14. Ham enzimin depolanma stabilitesinin saptanması

Bakteriden üretilen selülaz enziminin aktivitesinin saptanmasından sonra, enzimin belirli sıcaklıklarda depolanma stabilitesini saptamak için örnekler ayrılarak oda sıcaklığında (RT), +4 ºC' de ve -20 ºC' de tutulmuş ve 15 günde bir aktivite tayini yapılarak depolanma stabilitesi belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Mutant Bakterilerin Elde Edilmesi ve Enzim Üretiminin Kalitatif Olarak Saptanması

Mutant suşların elde edilmesi amacıyla, rastgele mutajenez yönteminde önemli bir mutajen olan Etil Metansülfonat (EMS, Sigma M-0880) 50- 500 µg/mL ve 4- 400 mg/mL arası konsantrasyonlarında kullanılmıştır. 50-500 µg/mL arasındaki EMS konsantrasyonlarının bakteri ölümü üzerine etki etmediği saptanmıştır. Bu nedenle EMS'nin 4-400 mg/mL arasındaki konsantrasyonları kullanılmıştır. 4 mg/mL konsantrasyonda bakteri ölümü üzerine bir etkisi gözlenmemiş olup, 400 mg/mL konsantrasyonda %100 ölüm gözlenmiştir. 20-60 mg/mL konsantrasyon aralığında yüksek ölüm oranları gözlenmiştir. Mutasyon çalışmaları her bir deneme için iki paralel çalışma olacak şekilde yapılmıştır. Yapılan paralel çalışmalarda genel olarak aynı sonuçlar elde edilmiştir. *Bacillus subtilis* ES171 suşu ile yapılan EMS mutasyon çalışması sonucu olarak toplamda yaklaşık olarak 538 adet mutant suş elde edilmiştir.

Kontrol olan ana suştan yüksek değerde Enzimatik İndeks (Eİ)'e sahip 4 adet mutant seçilmiştir. Bu mutantlar 0.5-1.25 mg/mL arası EMS konsantrasyonlarında elde edilmiş ve *Bacillus subtilis* IE1, IE2, IE3 ve IE4 olarak adlandırılmıştır. Ana suş ile mutant bakteriler kıyaslandığında 1.25 mg/mL EMS varlığında elde edilen mutant 4 için %97 oranında ölüm saptanırken, 0.5 mg/mL EMS varlığında elde edilen mutant 1 için %96, 0.75 mg/mL EMS varlığında elde edilen mutant 2 için %95 ve 1 mg/mL EMS varlığında elde edilen mutant 3 için %94 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Bacillus subtilis* 171ES'nin canlılık ve ölüm oranları üzerine EMS'nin etkisi

Bakteriler	Koloni Sayısı	Canlılık Oranı (%)	Ölüm Oranı (%)
Ana suş 171ES	128	100	0
Mutant IE1	5	4	96
Mutant IE2	6	5	95
Mutant IE3	7	6	94
Mutant IE4	4	3	97

Bu mutant suşların, uygulanan EMS dozları sonrası koloni ve selülaz hidroliz zonları ölçülerek Eİ değerleri hesaplanmış ve ana suşun Eİ değeri ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.2). Buna göre en yüksek Eİ değerini sırasıyla, 3.8 ile IE1, 3.7 ile IE3, 3.5 ile IE4 ve 2.7 ile IE2 mutantları göstermiştir. Mutasyon çalışmaları sonucunda ana suş olan 171ES'nin (Şekil 4.1) selülaz zon çapı, mutantların selülaz zon çapları ile de karşılaştırılmış (Şekil 4.2) ve kantitatif olarak enzim üretimlerini saptamak üzere 4 mutant suş denemeye alınmıştır.

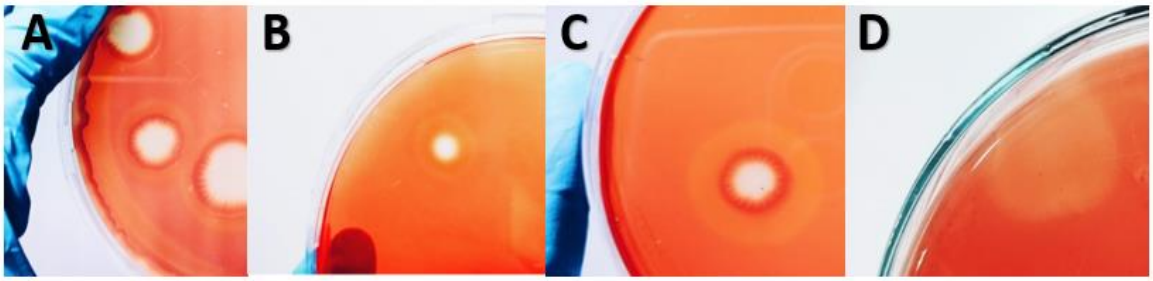
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan EMS denemeleri sonucu elde edilen mutant suşların koloni ve selülaz zon çapları

EMS Doz (mg/mL)	Koloni Çapı (mm)	Selülaz Zon Çapı (mm)	EI*	Koloni Sayısı
Kontrol	6	12	2	128
0,5	5	19	3,8	11
0,75	7	19	2,7	26
1	4	15	3,7	13
1,25	4	14	3,5	140
1,5	6	15	2,5	132
1,75	4	10	2,5	160
2	5	11	2,2	56

*Enzimatik İndeks (Eİ) :Selülaz zon çapı / Koloni çapı



Şekil 4.1. Ana suş olan ES171'in CMC agarlı ortamdaki koloni hidrolitik zon görüntüsü (12 mm)



Şekil 4.2. Mutantların CMC agarlı ortamdaki koloni hidrolitik zon görüntüleri. A: Mutant IE1 (19 mm), B: Mutant IE2 (19 mm), C: Mutant IE3 (17 mm), D: Mutant IE4 (14 mm)

4.2. Mutantların Enzim Üretiminin Kantitatif Olarak Saptanması

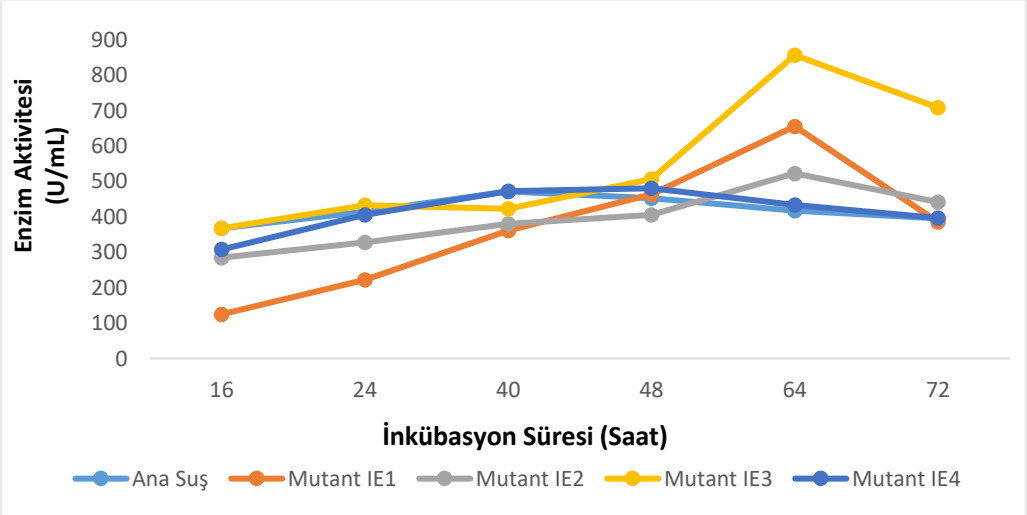
Mutasyon sonucu elde edilen mutantlar Çizelge 3.1'de içeriği verilen enzim üretim besi ortamında 16-72 saatler arasında üretilmişlerdir. Çalışma sonucunda ana suşta en yüksek enzim üretimi 40. saatte elde edilirken (472 IU/mL ve OD_{600} 1.2), mutantlar IE1 (656 IU/mL ve OD_{600} 1.2), IE2 (523 IU/mL ve OD_{600}1.1), IE3 (857 IU/mL ve OD_{600} 1.4) için 64. saatte, IE4 (481 IU/mL ve OD_{600} 0.8) mutantında ise 48. saatte elde edilmiştir (Çizelge 4.3). Mutant IE3'de ana suşa göre enzim veriminin %82 oranında arttığı, mutant IE1'de %39, mutant IE2'de %11 ve mutant IE4'de %2 oranında artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ana suş ve mutant suşlarda üremenin enzim üretimi ile paralellik gösterdiği görülmüştür.

Maksimum enzim üretimi ana ve mutant suşlarda logaritmik fazın ortasında elde edilmiştir (Şekil 4.3).

Bundan sonraki çalışmalarda en yüksek enzim aktivitesine sahip olan IE3 mutantı ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.3. Ana suş ve bunun mutant suşlarının selülaz üretim kapasitelerinin zamana bağlı karşılaştırılması

İnkübasyon süresi (saat)	Ana Bakteri		Mutant IE1		Mutant IE2		Mutant IE3		Mutant IE4	
	Üreme (OD_{600})	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Üreme (OD_{600})	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Üreme (OD_{600})	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Üreme (OD_{600})	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Üreme (OD_{600})	Enzim Aktivitesi (U/mL)
16	0,6	368	0,2	125	0,3	285	0,3	368	0,4	308
24	0,9	415	0,5	222	0,4	328	0,5	433	0,5	406
40	1.2	**472**	0,6	362	0,6	381	0,7	423	0,7	473
48	1.1	453	1,1	464	0,8	406	1.2	507	0,8	**481**
64	0.9	418	1.2	**656**	1.1	**523**	1,4	**857**	1,3	434
72	0,7	396	0.8	386	0,9	442	1,1	709	1.1	397



Şekil 4.3. Ana suş ve mutant bakterilerin zamana bağlı selülaz enzim üretimlerinin karşılaştırılması.

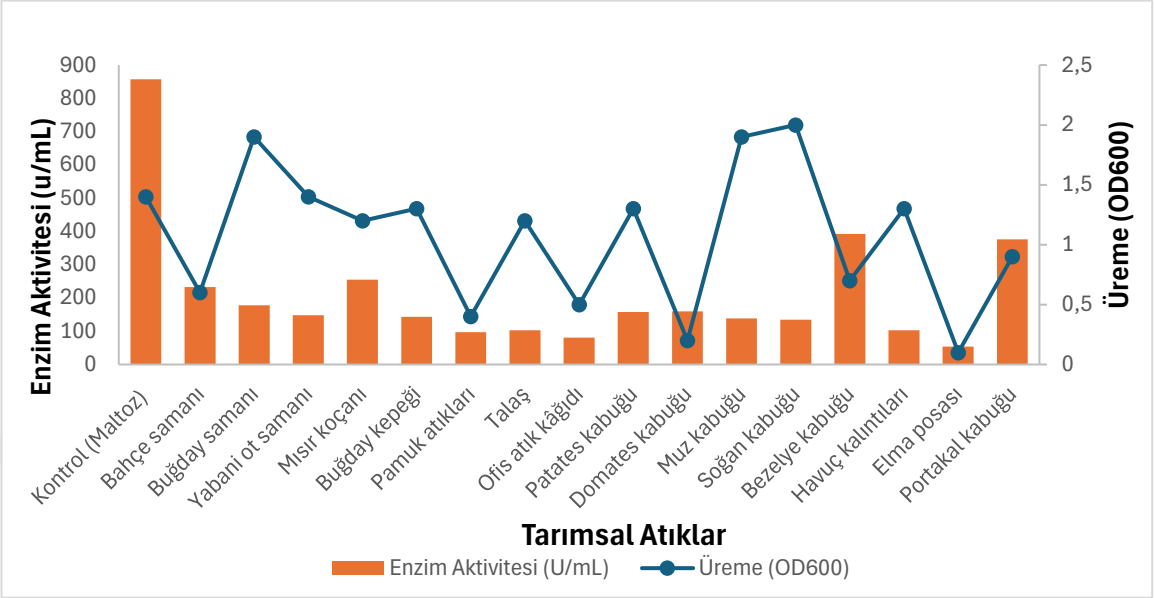
4.3. Enzim üretimi üzerine bazı tarımsal atıkların etkisi

Bakterilerin üreme kapasiteleri ve enzim üretimi üzerine etkileri saptanmak üzere besi ortamında bazı farklı tarımsal atıklar denenmiştir. Çizelge 3.1'de belirtilen besi ortamında karbon kaynağı olarak kullanılan maltozun yerine yine aynı (%1) olacak şekilde 16 ayrı tarımsal atık kaynağı denenmiştir. Bakteri üretim koşulları 3.2.2'de belirtildiği gibi uygulanmış, maksimum enzim aktivitesinin gözlendiği 64. saate kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda alınan örneklerin üremeleri ölçülmüş ve aktivite tayinleri yapılmıştır.

Denemeye alınan tarımsal atıkları içeren ortamlar mutant IE3 suşunun enzim üretimi açısından oldukça düşük değerler elde edilmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4). Dolayısı ile verimli bir sonuç elde edilmediğinden modifiye bir ortam oluşturulamamıştır ve kullanılan besi yeri ile çalışmalara devam edilmiştir.

Çizelge 4.4. Tarımsal atıkların bakteri üremesi ve selülaz üretimi üzerine etkileri

Tarımsal Atıklar	**Üreme (OD_{600})**	**Enzim Aktivitesi (U/mL)**	**Bağıl Aktivite (%)**
Kontrol (Maltoz)	1,4	857	100
Bahçe samanı	0,6	233	27
Buğday samanı	1,9	178	21
Yabani ot samanı	1,4	148	17
Mısır koçanı	1,2	255	30
Buğday kepeği	1,3	143	17
Pamuk atıkları	0,4	97	11
Talaş	1,2	103	12
Ofis atık kâğıdı	0,5	81	9
Patates kabuğu	1,3	158	18
Domates kabuğu	0,2	160	19
Muz kabuğu	1,9	138	16
Soğan kabuğu	2	135	16
Bezelye kabuğu	0,7	392	46
Havuç kalıntıları	1,3	103	12
Elma posası	0,1	54	6
Portakal kabuğu	0,9	376	44



Şekil 4.4. Tarımsal atıkların selülaz aktivitesi ve bakteri üremesi üzerine etkileri

4.4. Selülaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Kısmi saflaştırma için IE3 mutant suşu 3.2.2'de belirtildiği gibi üretime alınmıştır. Üretimden sonra kültür ortamı +4°C sıcaklıkta 5000 rpm'de santrifüjlenmiş, süpernatant ayrılıp ham enzim olarak kullanılmıştır. Ham enzim çözeltisine sırayla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon işlemleri uygulanarak kısmen saflaştırılmıştır. Her bir saflaştırma adımı sonrasında alınan örneklerin aktivite ve protein tayinleri daha önce belirtilen standart koşullarda üretilmiştir.

Kısmi saflaştırma için enzim %80 amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Çöktürme işlemi sonunda enzim, +4°C sıcaklıkta 10,000 rpm'de santrifüj edilmiş ve elde edilen pellet 50 mM sodyum fosfat (pH 6.5) tamponunda çözülmüştür. Çözülen örnek diyaliz tüpüne aktarılarak bir gece boyunca, +4°C'de diyaliz edilmiştir ve işlem boyunca tampon 3 kez değiştirilmiştir. Diyalizat ultrafiltrasyon (MW cut-off 30,000) tüpü ile konsantre edilmiş ve enzim %3 verim ile 8,1 kez saflaştırılmıştır. Saflaştırma basamakları ve elde edilen değerler sırasıyla Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Selülaz enziminin kısmi saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim[1] (%)	Saflık[2] (Kez)
Ham Enzim	100	455	85000	187	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (%80)	10	6,2	4940	797	5.8	4,3
Diyaliz	10	4,6	4800	1043	5.6	5,6
Ultrafiltrasyon	3	1,7	2560	1506	3	8,1

[1]Verim, toplam aktivite üzerinden hesaplanmıştır.
[2]Saflık, spesifik aktivite üzerinden hesaplanmıştır

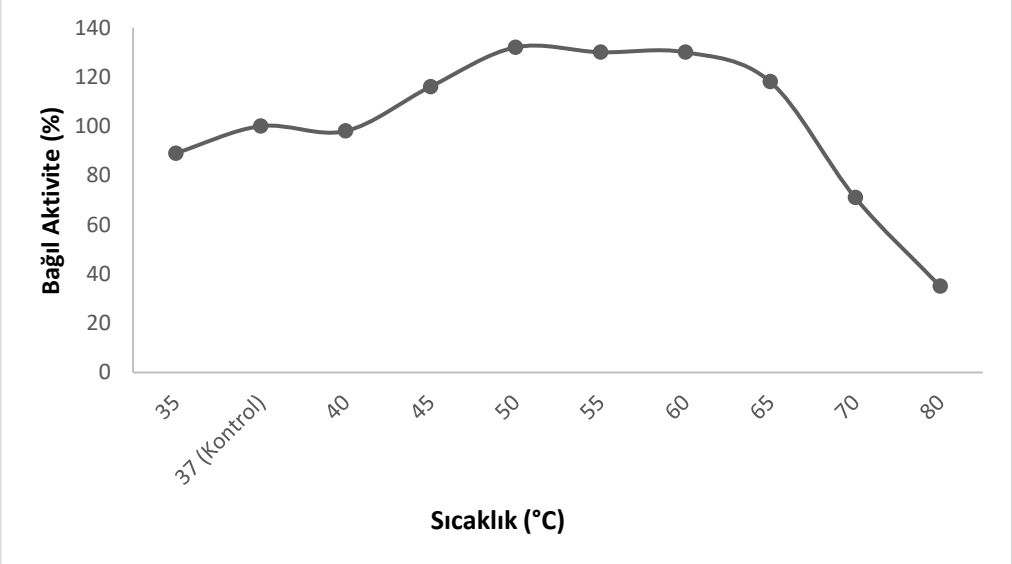
4.5. Kısmi Olarak Saflaştırılan Selülaz Enziminin Karakterizasyonu

4.5.1. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin etkisi

Kısmi olarak saflaştırılan selülaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin araştırılması amacıyla, 35, 37 (Kontrol), 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 80°C sıcaklık değerleri kullanılmıştır. Kontrol olarak kullanılan 37ºC sıcaklıktan elde edilen sonuç %100 olarak alınmış ve yapılan aktivite tayinleri sonucu elde edilen aktivite değerleri de % bağıl aktivite şeklinde hesaplanmıştır. Elde edilen verilere göre enzim optimum aktivitesini 50°C'de göstermiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.5). Sıcaklık her seferinde 5 derece artırılıp 65°C'ye ulaşana kadar aktivite değerleri kontrol sıcaklığına göre artış göstermiştir. 70°C'de enzimin aktivitesi %71 oranında korunmuştur. Yüksek sıcaklıklarda enzim aktivitesinde ciddi kayıplar gözlenmemiştir ancak, 80 °C'de enzim aktivitesinde önemli düşüş görülmüştür (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.5). Termostabil enzimler 50-70°C arasında kabul edildiğinden (Anonim, 2020) mutant IE3 enziminin termostabil karakterde olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.6. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Sıcaklık (°C)	Bağıl Aktivite (%)
35	89
37 (Kontrol)	100
40	98
50	132
55	130
60	130
65	118
70	71
80	35



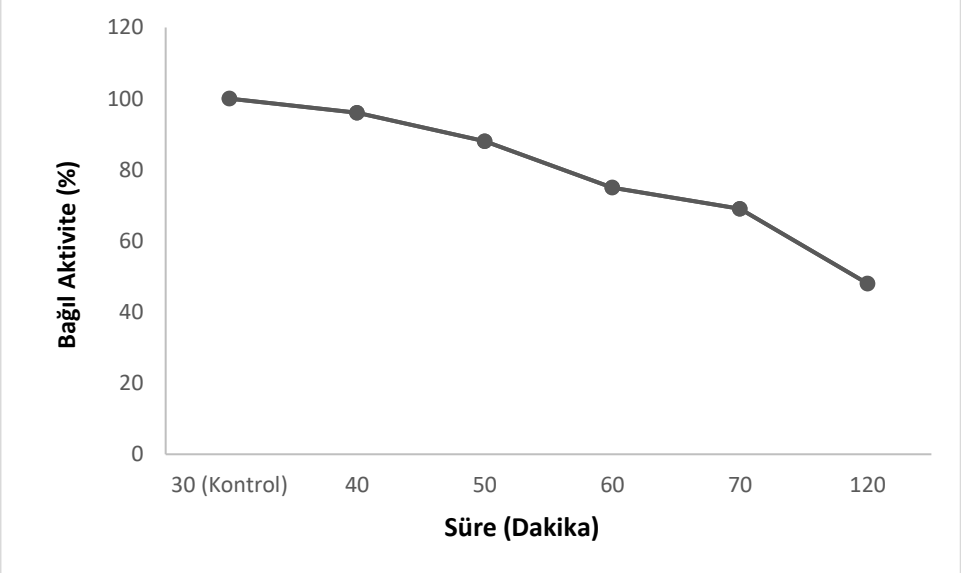
Şekil 4.5. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzimin maksimum aktivitesinin gözlendiği 50°C'de enzimin stabilitesi değerlendirilmiş ve bunun için aktivite ölçümü sırasında enzim içeren örnek tüpü su banyosuna alınarak 40, 50, 60, 70 ve 120 dakika sürelerle inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kısmen saf olan enzimin 70 dakika boyunca aktivitesini

koruyabildiği saptanmıştır (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.6). 120. dakikada ise enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. Sıcaklık stabilitesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

50 °C (Dakika)	Bağıl Aktivite (%)
30 (Kontrol)	100
40	96
50	88
60	75
70	69
120	48



Şekil 4.6. Sıcaklık stabilitesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.5.2. Enzim aktivitesi üzerine pH ve pH stabilitesinin etkisi

Enzimin optimum pH değerlerinin saptanması amacıyla selülaz enzimi farklı pH değerlerinde hazırlanan substrat çözeltileriyle inkübe edilmiştir. pH değerleri 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 6.5 (kontrol), 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 olarak belirlenip her biri için aktivite tayini yapılmıştır. Yapılan çalışmalar esnasında pH 6.5 değerinde elde edilen veriler kontrol

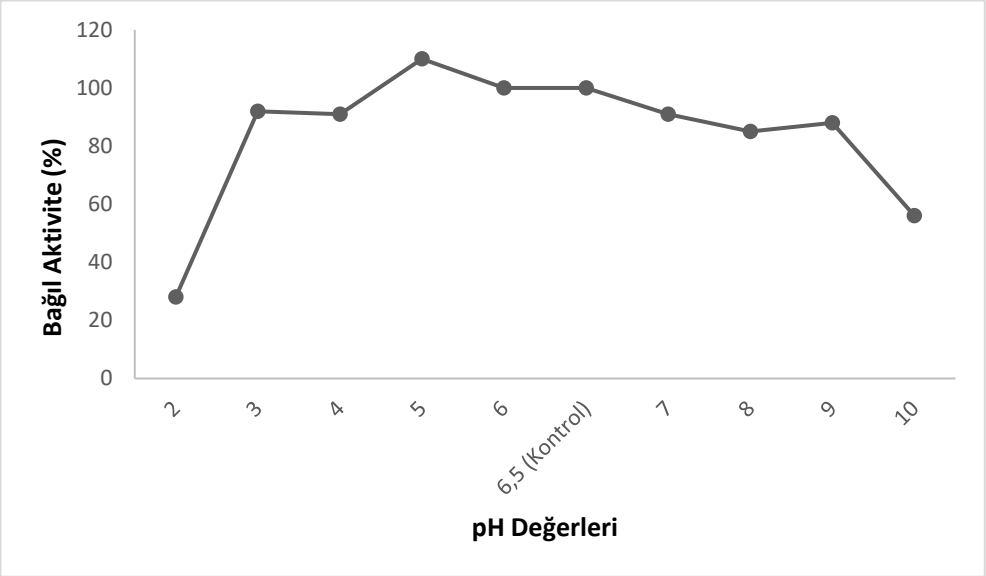
değeri kabul edilip diğer sonuçlar bu değere göre % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.8'de görüldüğü üzere enzimin optimum pH değeri 5.0 olarak saptanmıştır. Enzimin pH 3.0 ve 9.0 arasında aktif olduğu, dolayısı ile geniş bir pH aralığına sahip olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.7).

Çizelge 4.8. Enzim aktivitesi üzerine pH değerlerinin etkisi

pH	Bağıl Aktivite (%)
2	28
3	92
5	110
6	100
6,5 (Kontrol)	100
7	91
8	85
9	88
10	56

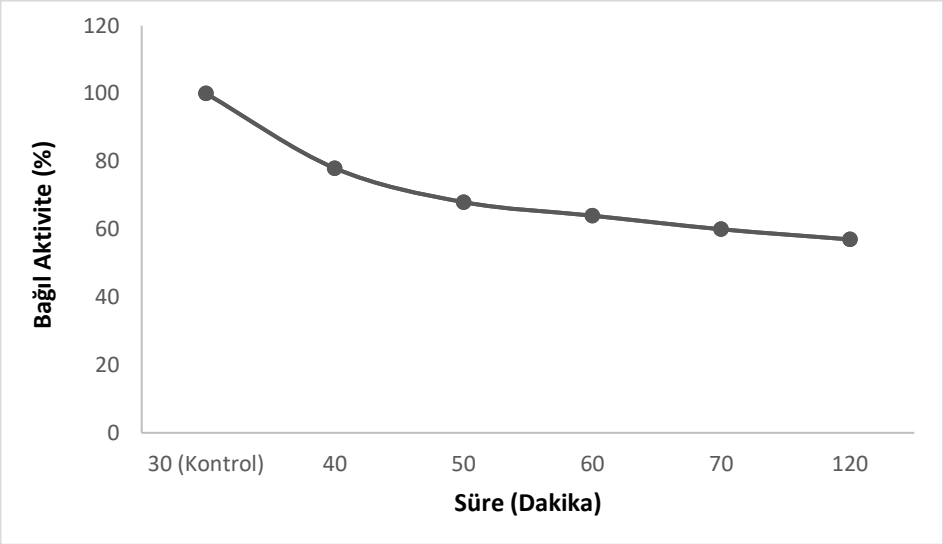
Çizelge 4.9. Enzim aktivitesi üzerine pH stabilitesinin etkisi

pH 5.0 (Dakika)	Bağıl Aktivite (%)
30 (Kontrol)	100
40	78
50	68
60	64
70	60
120	57



Şekil 4.7. Enzim aktivitesi üzerine pH değerlerinin etkisi

Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla enzim pH 5.0 değerinde 120 dakika su banyosu içerisinde inkübe edilmiş ve belirli dakikalarda örnekler alınarak aktivite tayini yapılmıştır. Enzimin 70 dakika boyunca aktivitesini koruduğu gözlenirken, süre artışıyla birlikte 120 dakika sonunda %43 oranında bir kayıp gözlenmiştir (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Enzim aktivitesi üzerine pH stabilitesinin etkisi

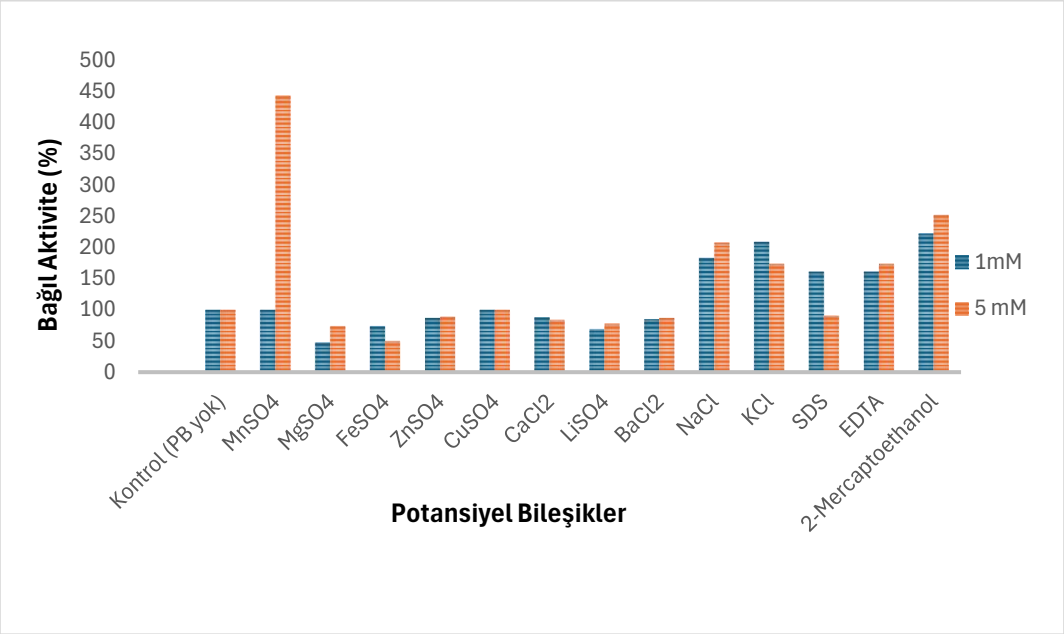
4.5.3. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi

Selülaz aktivitesi üzerine tuzların, metal iyonlarının ve redükleyici bileşiklerin etkisini araştırmak üzere enzim 1 ve 5 mM konsantrasyonlarda hazırlanan $MgSO_4$, $MnSO_4$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$, $LiSO_4$, $CaCl_2$, $BaCl_2$, KCl, NaCl, SDS, EDTA, 2-merkaptoetanol gibi farklı bileşiklerle inkübasyona bırakılmıştır. İçerisinde potansiyel bileşik bulunmayan ve sadece substrat çözeltisi kullanılarak elde edilen aktivite değeri kontrol olarak kullanılmış (%100) ve elde edilen değerler % olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.10).

5 mM konsantrasyondaki çoğu potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesini 1 mM'a göre artırdığı saptanmıştır. Bununla beraber MnSO4, NaCl, KCl metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine aktivatör etki yaptığı, diğer metal iyonlarının varlığında da aktivitesini koruduğu ve sadece $FeSO_4$'ın inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Anyonik karakterli bir deterjan olan SDS ve şelatlayıcı ajan EDTA, enzimi aktive ederken, disülfür bağlarının indirgenmesinde biyolojik anti-oksidant görevi yapan 2-Mercaptoethanol varlığında ise enzim aktivitesi artmıştır (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.9).

Çizelge 4.10. Potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Potansiyel Bileşikler	**Bağıl aktivite (%)**	
	1mM	**5mM**
Kontrol (potansiyel bileşik içermiyor)	100	100
$MnSO_4$	100	**443**
$MgSO_4$	48	74
$FeSO_4$	74	50
$ZnSO_4$	87	89
$CuSO_4$	100	100
$CaCl_2$	88	84
$LiSO_4$	69	78
$BaCl_2$	85	87
NaCl	183	208
KCl	209	174
SDS	161	91
EDTA	161	174
2-Mercaptoethanol	222	**252**



Şekil 4.9. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi

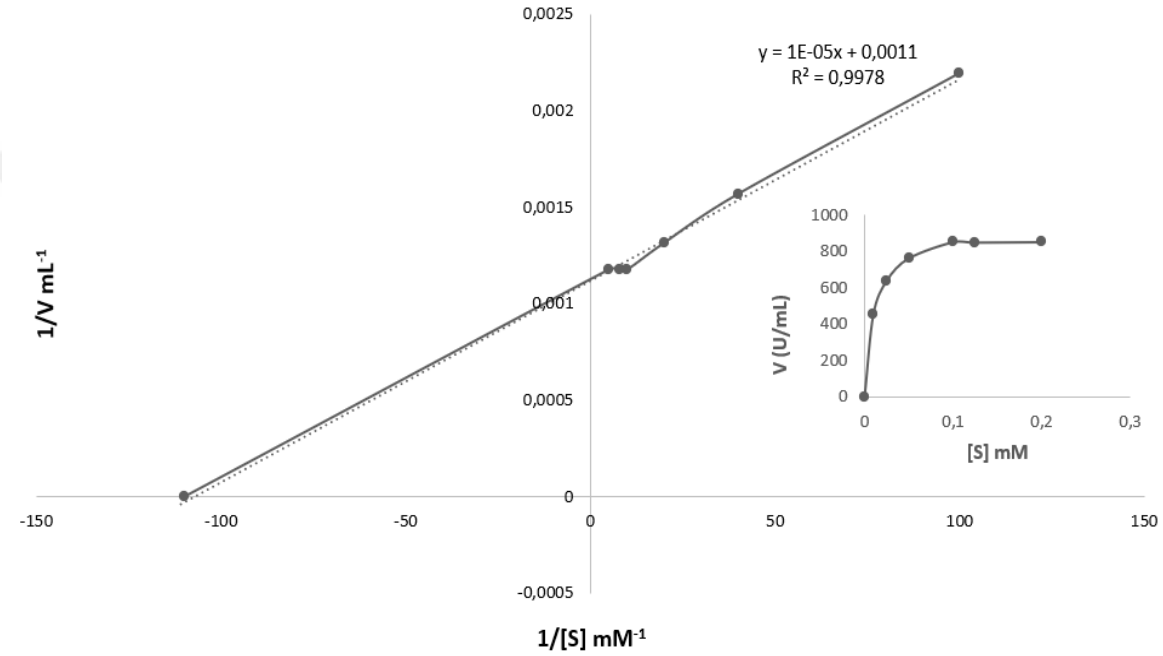
4.5.4. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonun etkisi

Selülaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisinin saptanması amacıyla optimum sıcaklık ve pH değerlerinde (37°C ve pH 6.5) belirlenen inkübasyon süresinde ortama 0,01-0,2 mM aralığındaki konsantrasyonlarda CMC eklenerek enzim aktivite tayini yapılmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Enzim aktivitesi üzerine substratın etkisi

Substrat Konsantrasyonu (mM)	Enzim Aktivitesi (U/mL)
0,01	456
0,025	638
0,05	761
0,1	850
0,125	848
0,2	850

Selülaz enziminin maksimum hızının (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitesinin (Km) saptanması amacıyla, 1/V'ye karşı 1/[S] olarak Lineweaver-Burk y = ax + b doğru grafiğinden yararlanıldı (Şekil 4.10). Bu grafikten elde edilen doğru denklemi y = 1E-05x+ 0,0011 olarak, tamamlayıcılık katsayısı (R2) ise R^2 = 0.9978 olarak bulundu. V_{max} değeri 909 U/mL olarak belirlenmiş ve Km değeri ise 0,01 mM olarak bulunmuştur.



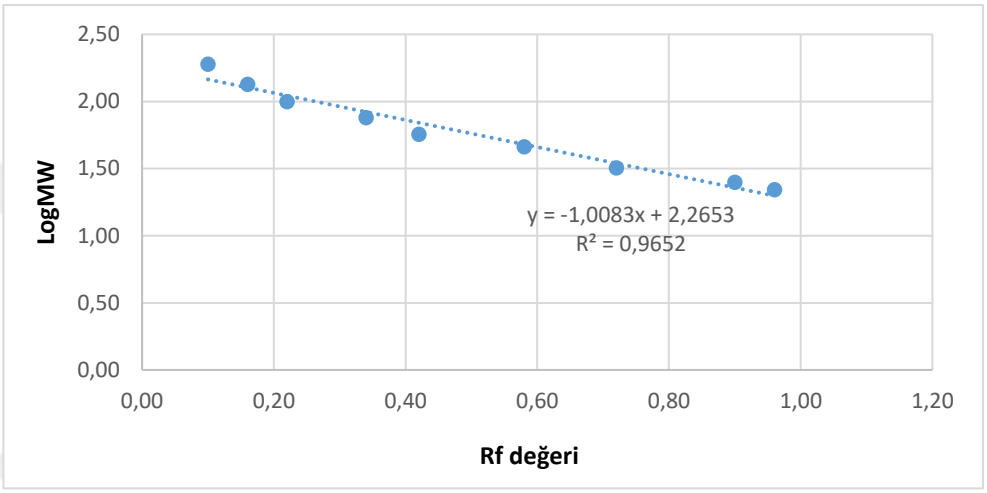
Şekil 4.10. Enzim aktivitesinin üzerine substrat konsantrasyonu etkisi (Lineweaver-Burk grafiği ve Michaelis- Menten grafiği).

4.5.5. Enzimin moleküler ağırlığının tespit edilmesi

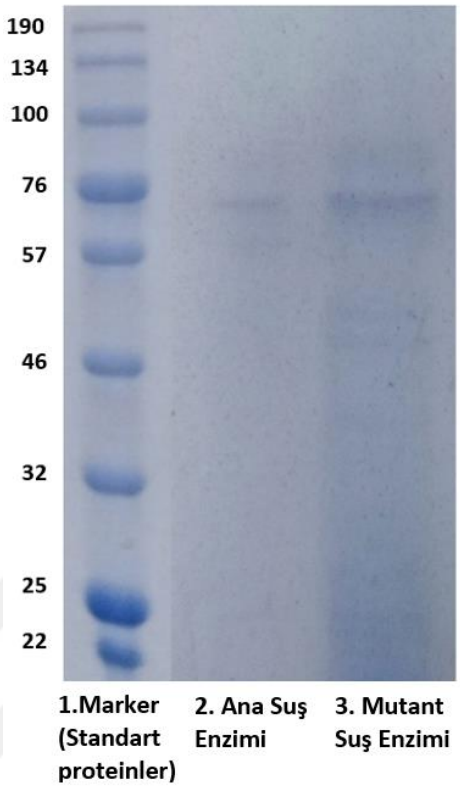
Mutant bakterinin selülaz enziminin moleküler ağırlığının saptanması için, elektroforez jeline enzim örneği, aynı jelde yanına ana bakteri enzimi ve moleküler ağırlıkları bilinen standart protein de belirteç olarak uygulanmıştır. Elektroforez sonunda beliren koyu bantların Rf değerlerinden faydalanarak enzim ve standart protein çözeltisinin hareketlilik değerleri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$Rf = \frac{Proteinin\ Aldığı\ Yol\ (cm)}{Izleme\ Boyasının\ Aldığı\ Yol\ (cm)}$$

Standart proteinlerin hareketlilik değerleri ve molekül ağırlıkların değerleri ile bir standart eğri çizilmiştir (Şekil 4.11). Çıkarılan grafiğin analizi yapılarak, örneğin moleküler ağırlığı tespit edilmiştir. Ana bakteri enzimi ve mutant bakteri enzim örnekleri şekil 4.12'de görüldüğü gibi tek bir bant olarak saptanmıştır. Her iki enzimin de moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 63 kDa olduğu tespit edilmiştir. Jel'de görüldüğü gibi mutant bakterinin enzimi koyu bir bant halinde elde edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. Standart proteinlerin Rf değerleri ve molekül ağırlıklarına göre oluşturulan standart eğri



Şekil 4.12. SDS-PAGE işleminden sonra elde edilen jelde protein bant görüntüsü

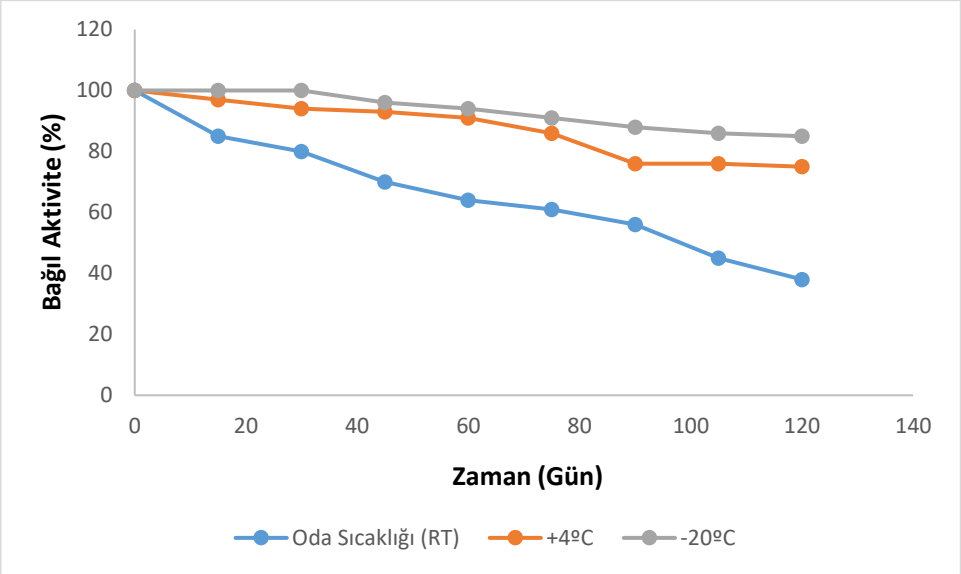
4.6. Ham Enzimin Depolanma Stabilitesinin Belirlenmesi

Mutant bakteriden elde edilen selülaz enziminin farklı sıcaklıklardaki depolanma stabilitesinin saptanması amacıyla bakteriden elde edilen ham enzimin başlangıç aktivitesi tayin edilip daha sonra enzim örnekleri oda sıcaklığında (RT), +4 ºC' de ve -20 ºC' de her 15 günde bir aktiviteleri ölçülerek depolama stabilitesi saptanmıştır.

Yapılan çalışma sonucu oda sıcaklığında (RT) 15 gün sonra, +4ºC'de 60 gün sonra enzim aktivitesinin korunduğu gözlenirken, bu süre -20ºC'de 75 güne kadar çıkmıştır. Depolama süresinin artması ile enzim aktivitesinde kayıplar gözlenmiştir. En iyi aktivite korunması -20 ºC'de gözlenmiş ve 120 gün içinde yalnızca %15 oranında aktivite kaybı gözlenmiştir. Enzim aktivitesinde en fazla kayıp oda sıcaklığında depolamada saptanmıştır (Çizelge 4.12 ve şekil 4.13).

Çizelge 4.12. Ham enzimin depolanma stabilitesi

Zaman (Gün)	Oda Sıcaklığı (RT)	+4°C	-20°C
	Bağıl Aktivite (%)	Bağıl Aktivite (%)	Bağıl Aktivite (%)
0	100	100	100
15	85	97	100
30	80	94	100
45	70	93	96
60	64	91	94
75	61	86	91
90	56	76	88
105	45	76	86
120	38	75	85



Şekil 4.13. Ham enzimin depolanma stabilitesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enzimler, çeşitli endüstriyel sektörlerde karmaşık üretim işlemlerini kolaylaştırmak için uzun süredir tercih edilmektedir. Günümüzde sürdürülebilir işlemlere olan talep, enzimlerin katalizör olarak çeşitli endüstriyel sektörlerde uygulanmasını büyük ölçüde artırmıştır. Buna ek olarak, protein ekstraksiyonu ve saflaştırılması alanında teknolojik gelişmeler ve protein mühendisliğindeki yenilikler, analitik saflık derecesinde oldukça gelişmiş ve özelleştirilmiş nitelikteki belli başlı enzimlerin verimli bir şekilde üretilmesine yol açmıştır.

Endüstriyel enzimlerin yaklaşık %60'lık kesimi mantarlardan, %24'ü bakterilerden, %4'ü maya hücrelerinden ve geri kalan %10'u ise bitki ve hayvan kaynaklarından üretilmektedir. Mikrobiyal enzimler yüksek verim, aktivite, uygun maliyetli üretim, tekrarlanabilirlik, hızlı ve üstel büyüme, kullanılan ortamın ucuz olması, kolay optimizasyon ve suş iyileştirmesi nedeniyle tercih edilmektedir (Fasim ve ark. 2021). Suş iyileştirmede tercih edilen yöntemlerden biri de çeşitli mutagenezlerle yapılan mutasyon çalışmalarıdır. Mutasyonlar, kültürlerin verimliliğini artırırlar. Yüksek verimli mutantlar elde etmek için kullanılan en yaygın yöntem, belirli bir 'istenilen' öldürme elde edilene kadar kültürü mutajenik bir ajanla muamele etmek, hayatta kalan kolonileri ayırarak ortaya çıkan her koloniyi veya rastgele seçilmiş bir koloni grubunu test etmektir. En yararlı mutajenler arasında nitrosoguanidin (NTG), 4-nitrokinolon-1-oksit, etilmetan sülfonat (EMS), metilmetan sülfonat (MMS), hidroksilamin (HA) ve ultraviyole (UV) bulunur (Adrio ve ark. 2006). Bakteriyel suşların genetik manüplasyonu amacıyla en fazla kullanılan kimyasal mutajen ise etil metan sülfonat (EMS)'dır (Haq ve ark. 2010).
Bu çalışmada ana suş *Bacillus subtilis* 171ES'ten yüksek düzeyde selülaz enzimi üreten mutant suşlar elde etmek amacı ile kimyasal bir mutajen olarak EMS kullanılmıştır. 0.5-1.25 mg/mL arası EMS konsantrasyonlarında yüksek değerde Enzimatik İndeks (Eİ)'e sahip 4 adet mutant suş elde edilmiştir. Bu mutantlar IE1, IE2, IE3 ve IE4 olarak adlandırılmıştır. Ana suş ile mutantlar kıyaslandığında 1.25 mg/mL EMS varlığında elde edilen IE4 için %97 oranında ölüm saptanırken, 0.5 mg/mL EMS varlığında elde edilen IE1 için %96, 0.75 mg/mL EMS varlığında elde edilen IE2 için %95 ve 1 mg/mL EMS

varlığında elde edilen IE3 için %94 olarak saptanmıştır. Bu mutant suşların enzimatik indeks (Eİ) değerleri ana şusun Eİ değeri (2) ile karşılaştırılmıştır. Buna göre en yüksek Eİ değeri sırasıyla, 3.8 ile IE1, 3.7 ile IE3, 3.5 ile IE4 ve 2.7 ile IE2 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu mutantların kantitatif olarak enzim verimlerini saptamak üzere üreme eğrileri ortaya çıkarılmıştır. Buna göre, ana suşta en yüksek enzim üretimi 40. saatte elde edilirken, mutantlar IE1, IE2, IE3 için 64. saatte, IE4 mutantında ise 48. saatte elde edilmiştir. Ana suşa göre (453 U/mL), sırasıyla IE3 (857 U/mL), IE1 (656 U/mL), IE2 (523 U/mL) ve IE4 (481 U/mL) daha çok enzim verimi elde edilmiştir.

Enzim üretimi açısından en verimli mutant IE3 olarak belirlenmiştir.

Ana suş ve mutant suşların üremelerine bakıldığında üremenin enzim üretimi ile paralellik gösterdiği saptanmıştır. Maksimum enzim üretimi ana ve mutant suşlarda logaritmik fazın ortasında elde edilmiştir.

Birçok araştırmacı, endüstriyel değere sahip olan selülaz enzimini yüksek verimde üreten yeni mutant suşlar elde etmek için çeşitli yöntemler kullanmışlardır. Yapılan bir mutasyon çalışmasında endoglukanaz aktivitesinin iyileştirilmesi, hata-yönelimli dairesel amplifikasyon kullanılarak ve 1.7 mM $MnCl_2$ ile desteklenerek gerçekleştirilmiştir. *Bacillus amyloliquefaciens* endoglukanaz geninde kilobaz başına 10 mutasyon sıklığıyla rastgele mutasyonlar oluşturulmuştur. Altı farklı koloniden elde edilen mutasyona uğramış endoglukanaz geni, ana suştan 2.50 ila 3.12 kat daha yüksek endoglukanaz aktivitesine sahipti. Mutasyonlu endoglukanaz dizilerinde beş farklı amino asit mutasyonu tespit edilmiştir. Bu beş mutasyondan, E289V'nin iyileştirilmiş selülaz enzimi aktivitesinden sorumlu olduğu belirlenmiş ve alan-hedefli mutagenez ile doğrulanarak suşun enzimatik aktivitesini ana suşa oranla 7.93 kat artırdığı gözlenmiştir (Vu, 2012).

Narasimhan ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları çalışmada, EMS mutagenezi ile elde edilen *B. subtilis* mutantlarının antifungal biyokontrol ajanı olarak kullanılma potansiyeli ve suştan elde edilen mikolitik enzimlerin (kitinaz, β-1,3-glukanaz ve selülaz) aktivitesi

gözlenmiştir. Tüm bu mutantlar arasında, M57 sırasıyla β-1,3-glukanaz ve selülaz aktivitelerinde 36 kat ve 4,71 kat artış, hidrolitik aktivitede ise 1,95 kat artış göstermiştir. Sadhu ve arkadaşları tarafından (2014), inek gübresinden izole edilen ve *Bacillus* sp. C1M suşunun, mutajenik bir ajan olan NTG (N-metil-N′-nitro-N-nitrosoguanidin) ile mutasyona uğratılarak selülaz enzimi üretim yeteneği araştırılmış ve ana bakteriye göre 1,7 kat daha verimli selülaz enzimi ürettiği gözlenmiştir.

Basheer ve Salman (2016), Irak topraklarından izole edilen, *Bacillus* sp.'nin selülaz üretme kapasitesine sahip B16 izolatını, EMS mutagenezine maruz bırakarak ana suş ve mutantın aktivite değerlerini gözlemlemişlerdir. Kantitatif selülaz aktivitesi tayininde, mutasyon öncesi ve sonrasında (50 µg/mL EMS konsantrasyonu) değerler sırasıyla 0.59 U/mL ve 1.21 U/mL bulunmuştur. EMS'nin mutant örnekte ana suşa kıyasla termofilik selülaz üretimini artırabildiği için aktif bir kimyasal mutajen olduğu sonucuna varılmıştır.

Ega ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilis* VS15'in selülaz aktivitesini iyileştirmek amaçlı çeşitli mutajenlere maruz bırakılmıştır. Mutant eldesi için, UV ile NTG ve EMS mutajenleri kullanılmıştır. Optimum dozun saptanması amacı ile çeşitli dozlarda EMS (0,620–1,48 mM), NTG (2–5 µg) ve UV (1–10 dk) test edilmiş ve alınan sonuçlardan optimum oranlar sırasıyla 0,931 mM EMS, 2 µg oranında NTG ve 3 dk UV'ye maruz bırakma sonucu elde edilmiştir. Altı mutantın hepsinde vahşi tipe (3,77 IU/mL) kıyasla 3,77–5,9 IU/mL aralığında küçük düzeyde bir selülaz üretimi artışı gözlenmiştir. Selülaz üreticisi altı mutant suş, yabani suş VS15 ile genom karıştırma yöntemi uygulanarak protoplast füzyonuna maruz bırakılmış ve elde edilen Gd7 suşu selülaz üretimini %167 oranında artırmıştır.

Klasik bir mutasyon tekniği olan EMS ile spontan mutasyonların yapılması yeni verimli mutantların elde edilmesinde önemlidir. Spontan mutasyonun sıklığı organizmalar arasında farklılık gösterdiği gibi aynı türler içinde bile spontan mutasyon sıklığı her gen için değişiklik göstermektedir. Organizmalar arası görülen bu değişkenliğin, hata okuma ve onarım sistemlerinden dolayı oluşabileceği düşünülmektedir. Diğer yandan elde edilen değerlere göre yapılan mutagenezin, selülazın düzenleyici genlerinin mutasyonu veya

bazı bilinmeyen mekanizmalar yoluyla selülaz üretiminin artmasına neden olduğu sonucuna varılmıştır (Sadhu ve ark. 2014).

Bu çalışmada ana suş olan 171ES'in maksimum aktivite gösterdiği modifiye ortam kullanılmıştır. IE3 mutant enzimi (857 U/mL), ana suşa kıyasla (453 U/mL) yaklaşık olarak 2 kat daha fazla enzim aktivitesi göstermiştir (Msakni, 2020).

Çalışmada mutant IE3 bakterisinden enzim üretimi üzerine bir etkisi olup olmadığı araştırılmak üzere, karbon kaynağı olarak çeşitli organik atıklar denenmiştir. Bu amaçla, bahçe samanı, buğday samanı, yabani ot samanı, mısır koçanı, buğday kepeği, pamuk atıkları, talaş, ofis atık kâğıdı, patates kabuğu, domates kabuğu, muz kabuğu, soğan kabuğu, bezelye kabuğu, havuç kalıntıları, elma posası ve portakal kabuğu gibi tarımsal, sebze ve meyve atıkları denemeye alınmıştır. Enzim üretim besi yerinde karbon kaynağı maltoz yerine yine aynı oranda (%1) eklenen 16 farklı tarımsal atık kaynağı kullanılmıştır. Mutant bakteri maksimum enzim üretiminin elde edildiği 64 saat boyunca inkübe edilmiş ve bu saatin sonunda alınan örneklerin üreme ve selülaz aktivitesi tayinleri yapılmıştır. Denemeye alınan organik kaynakları içeren ortamlardan verimli bir sonuç elde edilmemiştir.
Çeşitli araştırmacılar farklı organik kaynaklı atıklar kullanarak enzim üretiminin üzerine etkilerini araştırmışlar ve bu araştırmalar sonucunda birbirinden farklı sonuçlara ulaşmışlardır.

Waseem ve ark. (2014) tarafından raporlanan sonuçlara göre, *Bacillus subtilis* CB-2 suşunda en yüksek selülaz aktivitesini rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmada maksimum selülaz enzim üretimini karbon kaynağı olarak %2 oranında kullanılan işlenmemiş pamuk sapı ortamında elde etmişlerdir.

Bacillus vallismortis tarafından bakteri ve selülaz üretimi üzerine karbon kaynağı olarak tarımsal atıkların etkisi Gaur ve Tiwari (2015) tarafından pirinç kepeği, buğday kepeği, mısır kepeği, pirinç kabuğu şeker kamışı ve bagasse (şeker kamışının işlenmesinden sonra, kalan kuru posalı lifli kalıntısı) atıkları kullanılıp araştırılmıştır. 12-96 saat

inkübasyon aralığında en iyi değerler 48. saatte alınmış ve selülaz üretimi için en verimli substrat olarak %2 oranında eklenen şeker kamışı bagasse (4105 U/mL), ardından pirinç kabuğu (3509 U/mL) ve pirinç kepeği (3110 U/mL) bulundu. Minimum selülaz üretimi için ise buğday kepeği (2890 U/mL) ve mısır kepeği (2545 U/mL) rapor edilmiştir.

Lugani ve ark. (2015) tarafından *Bacillus* sp. Y3 olarak adlandırılmış en iyi izolat glukoz, laktoz, buğday kepeği, pirinç kepeği ve CMC gibi farklı karbon kaynakları ile 37°C sıcaklıkta 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Karbon kaynağı olarak maksimum verim CMC içeren ortamda alınmış ve selülaz aktivitesi (4.49 IU/mL) olarak rapor edilmiştir.

Roopa ve arkadaşlarının (2017) yaptığı bir çalışmada saman, Palmyra palmiyesinin lif atığı ve muz yaprakları gibi tarımsal atıklar selülaz üretimi için substrat olarak kullanılmıştır. Palmiye lifleri (600 $\mu g/mL^{-1}$), muz çiçekleri (420 $\mu g/mL^{-1}$) ve saman (260 $\mu g/mL^{-1}$) olarak raporlanmıştır. Sonuç olarak Palmyra palmiyesi liflerinin 48 saatlik inkübasyonda maksimum selülaz aktivitesi verdiği gözlenmiştir.

Yapılan birçok bilimsel araştırma sonucu, kullanılan farklı karbon kaynaklarının ve değişen parametrelerin selülaz etkinliği üzerinde değişen sonuçlar gösterdiği gözlenmiştir. Değişkenlik gösteren bu sonuçlar da, mikroorganizmaların enzim üretim sürecinde farklı metabolik yollar kullandığını gösterir. Ayrıca, selülaz üretimini indükleyen olarak işlev gören bir substratın varlığına bağlı olarak indüklenebilir bir enzim olduğu sonucuna varılmıştır.

Enzimlerin çeşitli özelliklerinin araştırılması yani karakterize edilmesi enzim hakkında bize önemli bilgiler vermektedir. Elde edilen bu bilgiler endüstride kullanımları için önem taşımaktadır. Bu yüzden karakterizasyonda önemli parametreler dikkate alınmaktadır. Bunlardan özellikle optimum sıcaklık ve pH'larının bilinmesi enzimlerin endüstriyel alanlardaki kullanım potansiyelini göstermektedir. Bu parametreler enzimin üç boyutlu yapısını etkileyebilmektedir (Zekeya ve ark. 2019).

Endüstride kullanılan enzimlerin çoğu metalloenzim olduğundan karakterizasyonda bunun ortaya çıkarılması da önemlidir. Metalloenzimler herhangi bir aktivite gösterebilmek için ortamlarında metal iyonlarına gereksinim duyan enzimlerdir. Ortamdaki metalik iyonlar, metalik tuz çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak enzimin katalitik bölgesinde bulunan aminoasitlerin yan gruplarına bağlanmakta enzimi ya inhibe etmekte ya da uyarmaktadır. Bu da doğal olarak enzimin aktifliğine yansımaktadır.

Ayrıca enzimlerin kinetiksel özellikleri (K_m ve V_{max} değerleri) de önem taşımaktadır. Bu özellikler enzimin belli bir substrat ile ne kadar çabuk doyuma ulaştığı (K_m) ve ulaşabildiği en hızlı (V_{max}) reaksiyonunu göstermektedir. Kinetiksel özelliklerin bilinmesi bir enzimin hücre içindeki davranışını ve o şartlardaki değişikliklere nasıl tepkiler verdiği hakkında fikir verebilmektedir. K_m değeri arttıkça enzimin substrata olan ilgisi düşmektedir. Aynı zamanda K_m değeri düştükçe enzimin substrat olan ilgisi artmaktadır. Diğer yandan düşük K_m değerine sahip enzimler substratlarına karşı yüksek ilgiye sahip olduğundan dolayı endüstride önem taşımaktadırlar.

Bu çalışmada, mutant suş olan IE3'ün selülaz enziminin özelliklerini belirlemek amacı ile enzim kısmi olarak saflaştırılmıştır. Üç basamakta gerçekleştirilen sırasıyla saflaştırma işleminde; amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon basamakları uygulanmıştır. Bu işlem basamakları sonunda enzim %3 verimle 8,1 kez saflaştırılmıştır. Kısmi olarak saf haldeki enzimin üzerine sıcaklık ve stabilitesi, pH ve stabilitesi ve potansiyel bileşiklerin etkileri araştırılmıştır. Daha sonra selülaz enzimin K_m ve V_{max} değerleri saptanmış, molekül ağırlığı belirlenerek enzim karakterize edilmiştir.

Çalışmada sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında, mutant IE3'ün selülaz enziminin 50°C'de optimum aktivite gösterdiği saptanmıştır. Sıcaklığın her 5 derece arttırılması ile 65 °C'ye kadar aktivite değerleri kontrol sıcaklığa göre artmıştır. 70 °C'de enzim aktivitesi %71 oranında korunmuştur. Bu da enzimin ısıya dayanıklı (termostabil: 50-70°C) karakterde olduğunu göstermektedir. Ancak daha yüksek sıcaklıklarda (ekstrem termofil: 70-100°C) 80°C'de aktivitede dramatik düşüş gözlenmiştir. Bu da enzimin belirli

bir sıcaklık aşıldıktan sonra denatüre olduğunu ve aktivitelerini kaybettiğini göstermiştir. Enzimin optimum aktiviteye sahip olduğu 50°C'de enzimin stabilitesi kontrol edildiğinde enzimin 70 dakika boyunca aktivitesini % 69 oranında koruduğu saptanmıştır. Yine bu sonuç da enzimin ısıya dayanıklı (termostabil) karakterde olduğunu göstermiştir.

Enzimin optimum pH değeri 5.0 olarak belirlenmiştir. Enzimin alkali ortama nazaran asidik ortamda daha yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ancak alkali ortamda da pH 9.0'da %88 oranında korumuştur. Dolayısıyla, enzimin pH 3.0 ve 9.0 arasında aktif olması enzimin geniş bir pH aralığında aktif olduğunu göstermiştir. Bu da farklı endüstriyel uygulamalar için önemlidir.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH 5.0'de enzimin stabilitesi kontrol edildiğinde enzimin 70 dakika boyunca aktivitesini % 60 oranında koruduğu saptanmıştır. Süre artışıyla beraber 120 dakika sonunda %57 oranında aktif kalmıştır.

Metal iyonları kofaktör olarak görev yaparak enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etki yaratabilirler. Bu çalışmada enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının, tuzların ve redükleyici bileşiklerin etkisi saptanmıştır. $MnSO_4$, NaCl, KCl metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine aktivatör etki yaptığı, diğer metal iyonlarının varlığında da aktivitesini koruduğu ve sadece $FeSO_4$'ın inhibitör etki yarattığı saptanmıştır. Bu da enzimin metalloenzim olduğunu göstermiştir. Diğer yandan, anyonik karakterde bir deterjan olan SDS ve şelatlayıcı bir ajan olan EDTA enzimi etkili bir şekilde aktive ederken, disülfür bağlarının indirgenmesinde biyolojik anti-oksidant görevi yapan 2-Merkaptoethanol varlığında ise enzim aktivitesi artmıştır.

Enzimin kinetik özelliklerinden V_{max} değeri 909 U/mL olarak, K_m değeri ise 0,01 mM olarak saptanmıştır. Düşük K_m oranının olması endüstride potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Bacillus subtilis'den elde edilen mutant suş IE3'ün moleküler ağırlığı tespitinde SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Ana bakteri enzimi ve mutant bakteri enzimlerinin moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak 63 kDa olduğu tespit edilmiştir.

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, kullanılan *Bacillus* türlerinin ve diğer çeşitli mikroorganizmaların ürettiği selülaz enziminin farklı karakteristik özellikleri ortaya çıkarılmıştır.

Sriariyanun ve arkadaşlarının (2016) yaptığı bir çalışmada *Bacillus* sp., MSL2 suşu, selülaz testi taramasına dayanarak izole edildi. Saflaştırılmış selülaz enziminin molekül ağırlığı, SDS-PAGE ve zimogram analizi ile 48 kDa olarak tespit edilmiştir. 1M IL (ionic liquid), 1-etil-3-metilimidazolyum asetat konsantrasyonunun varlığında, selülaz aktivitesi IL içermeyen aktivite sonucuna göre %77,7'sini korumuştur. Ayrıca, enzimin optimum sıcaklığı ve pH'ı sırasıyla 50 °C ve pH 6,0 olarak saptanmıştır. Ancak, bu selülaz aktivitesinin 55 °C ve pH 4,0'da %90'dan fazla oranda korunduğu ortaya çıkmıştır. Saflaştırılmış enzimin kinetik analizi, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,8 mg/mL ve 1000 µM/dk olduğunu göstermiştir.

Azadian ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada *Bacillus sonorensis* HSC7'den elde edilen selülaz enzimi 70 °C 'lik optimum sıcaklıkta aktif olmuş ve optimum aktivitesi ve stabilitesi sırasıyla pH 4,0 ve pH 5,0'de gözlenmiştir. Bunlar, bu enzimin asidofilik ve termofilik olabileceğini gösteren özelliklerdir. Ayrıca, enzim aktivitesi metanol, kloroform Mg^{+2}, Cu^{+2} ve Triton X-100 varlığında ile iyileşirken, DMF varlığında inhibe olmuştur. Enzim, 412.3 U/mg aktivite ile yaklaşık olarak 8.85 kez saflaştırılmıştır. Enzim moleküler ağırlığı SDS-PAGE yöntemiyle 37 kDa olarak belirtilmiştir.

Sulyman ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada, *Aspergillus niger'*den elde edilen selülaz enziminin karakterizasyonu ve kısmi saflaştırılması yapılmıştır. Selülaz aktivitesi için optimum pH 4.0 olarak ve sıcaklık ise 40 °C olarak saptanmıştır. Enzim, %3,87 verim ile 68,12 kata kadar saflaştırılmıştır ve özgül aktivitesi 484,3 U/mL şeklinde raporlanmıştır. Selülaz için Vmax 9,26 U/mL ve Km 0,23 mg /mL değerleri saptanmıştır. Selülazın moleküler ağırlığı, SDS-PAGE yöntemiyle yaklaşık olarak 13,5 kDa olarak bulunmuştur.

Malik ve Jevad (2021) tarafından yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilis* CD001'den elde edilen selülaz kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Kısmi saflaştırma sonrası protein konsantrasyonunun 1,2 mg/ml olduğu ortaya konmuştur. Selülazın optimum aktivitesi pH 5.0 ve 60°C sıcaklıkta gözlemlenmiştir. SDS-PAGE analizi ile selülazın yaklaşık 55 kDa moleküler ağırlığında olduğu ortaya konulmuştur. Zimogram analizi ile de enzimin karboksimetil selüloz (CMC) gibi substratları hidrolize edebildiği kanıtlanmıştır. Kinetik analiz sonuçlarına göre, K_m değeri 0,996 mM ve V_{max} değeri 1,647 U/mL olarak rapor edilmiştir. Enzim aktivitesi, $MnSO_4$, $ZnSO_4$ ve $MgSO_4$ ile artarken, EDTA ve β-merkaptoetanol ile inhibe edilmiştir.

Shyaula ve ark. (2023) tarafından yapılan çalışmada, Himalaya toprağından izole edilen *Bacillus licheniformis* PANG L suşunun ürettiği selülaz enziminin karakterizasyonu ve saflaştırması yapılmıştır. Enzim, %80 amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından diyaliz basamakları ile kısmen saflaştırılmış ve enzimin 1,52 kat saflaştığı raporlanmıştır. Kısmen saflaştırılmış selülazın optimum aktivitesi 60°C sıcaklık ve pH 5.0 değerlerinde gözlendi. Selülaz enzimi 3.0-5.0 pH aralıklarında stabil olup ve 55°C sıcaklıkta bile aktivitesinin %67'sini koruyabildiği tespit edilmiştir. Selülaz aktivitesinin Cd^{2+}, Pb^{2+} ve Ba^{2+} gibi metal iyonlarının varlığında arttığı gözlenmiştir. Substrat olarak CMC kullanıldığında enzim, en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,8 mg/mL ve 10,92 µ g/mL/dak şeklinde rapor edilmiştir.

Mutant bakteriden elde edilen selülaz enziminin farklı sıcaklıklarda depolanma stabilitesinin saptaması amacıyla ham enzimin başlangıç aktivitesi belirlenmiş ve örnekleri oda sıcaklığında (RT), +4 ºC ve -20 ºC' de olmak üzere üç farklı sıcaklıkta muhafaza edilerek her 15 günde bir aktiviteleri kontrol edilerek depolama stabilitesi saptanmıştır. Çalışma sonucu oda sıcaklığında (RT) 15 gün sonra, +4ºC'de ise 60 gün sonra enzim aktivitesinin korunduğu gözlenirken, bu süre -20 ºC'de 75 güne kadar çıkmıştır. Depolama süresinin artması ile enzim aktivitesinde kayıplar gözlenmiştir. Enzim aktivitesinin en iyi korunduğu depolama -20 ºC'de gerçekleşmiş ve 120 günde yalnızca %15 oranında bir aktivite kaybı gözlenmiştir. +4ºC'de 120 gün sonunda enzim

aktivitesinde %25 oranında kayıp tespit edilirken, en fazla kayıp oda sıcaklığındaki depolamada olmuştur. Oda sıcaklığında 120 gün sonunda %62 oranında bir kayıp saptanmıştır.

Nisar ve arkadaşlarının (2022) yaptığı çalışmada, enzimlerin raf ömrü 4°C ve 30 °C' de 30 gün boyunca depolanmasıyla saptanmıştır. Sonuçlar, endoglukonaz ve β-glukozidaz enzimlerinin 4 °C'de 20 gün depolandığında, %80 oranında aktivite göstererek daha kararlı olmakla beraber, 30 günün ardından kalan aktivite oranının %60 olduğu kaydedilmiştir.

Shyaula ve arkadaşlarının (2023) yaptığı çalışmada selülaz enzimi, 25°C'de 25 gün boyunca depolandıktan sonra aktivitesinin %72'sini korurken, -20°C' de depolanan enzim aktivitesinin %98,8'i korunabilmiştir. 4°C'de ise yaklaşık olarak %8 oranında bir aktivite kaybı saptanmıştır. Enzimin oda sıcaklığında 10 günden daha az bir süre stabil olarak kalabildiği ve ardından hafif bir düşüşe geçtiği gözlemlenmiştir. Ancak, Islam ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus* sp.'den elde edilen selülaz enzimi oda sıcaklığında depolandığı ilk hafta aktivitesinin %95'i korunurken, 28 gün sonra aktivitesinin yalnızca %68' inin korunduğu saptanmıştır.

Selülaz enzimi özellikle tekstil, hayvan beslenmesi ve gıda gibi farklı endüstri alanlarında kullanımı olan ve her geçen gün kullanım oranı artan önemli bir endüstriyel enzimdir. Bu çalışma sonucunda ana suş *Bacillus subtilis* 171ES üzerine uygulanan rastgele mutasyon çalışmaları sonucu elde edilen verimli mutant *Bacillus subtilis* IE3, selülaz enziminin karakterizasyon çalışmaları bu enzimin endüstriyel alanda potansiyele sahip olabileceğini göstermiştir. Dış ülkelerden ithal edilen selülazın ülkemizde geniş çapta üretilebilmesi ve böylece ülke ekonomisine katkıda bulunulması olasıdır.

KAYNAKLAR

Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2006). Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiology Reviews, 30*(2), 187-214. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00009.x

Ahmed, A., & Bibi, A. (2018). Fungal cellulase; production and applications: Minireview. *Liberal Arts and Social Sciences International Journal, 4*(1), 19-36. https://doi.org/10.20319/lijhls.2018.41.1936

Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Cihan, A.C. & Chaulagain, B.P. (2013). Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. *BioMed Research International*, http://dx.doi.org/10.1155/2013/204014.

Anonim (2014). Ethyl methanesulfonate https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ethyl_methanesulfonate_200.svg

Anonim (2020). Thermostable USER III Enzyme. https://www.neb.ca/M5509

Anonim (2023a). Selülaz. https://tr.wikipedia.org/wiki/Sel%C3%BClaz

Anonim (2023b). Basil. https://tr.wikipedia.org/wiki/Basil

Anonim (2024a). Enzymes in industry. https://sepmag.eu/blog/enzymes-in-industry/

Anonim (2024b). Global Cellulase Market Insights, Forecast to 2030. https://reports.valuates.com/market-reports/QYRE-Auto-1P12307/global-cellulase

Anonim (2024c). 3,5-Dinitrosalicylic acid. https://en.wikipedia.org/wiki/3,5-Dinitrosalicylic_acid

Anonim (2024c). Enzim. https://tr.wikipedia.org/wiki/Enzim

Anonim (2024d). İndirgeyici şeker. https://tr.wikipedia.org/wiki/%C4%B0ndirgeyici_%C5%9Feker

Anonim (2024e). Mutasyon. https://tr.wikipedia.org/wiki/Mutasyon

Arda, M. (2000). *Temel mikrobiyoloji*. Medisan Yayınları.

Axelrod, S., Saez, L., & Young, M. (2015). Studying circadian rhythm and sleep using genetic screens in Drosophila. *Methods in Enzymology*, 551, 3-27.

Ayhan, K. (2000). *Gıdalarda bulunan mikroorganizmalar*. In *Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları* (pp. 43-44). Sim Matbaacılık Ltd

Azadian, F., Badoei-dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., Karami, Z., & Hassanshahian, M. (2017). Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable cellulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversion of lignocellulosic wastes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 187-196. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.005

Baghaei, B., & Skrifvars, M. (2020). All-cellulose composites: A review of recent studies on structure, properties and applications. *Molecules, 25*(12). https://doi.org/10.3390/molecules25122836

Balla, A., Silini, A., Cherif-Silini, H., Bouket, A. C., Boudechicha, A., Luptakova, L., Alenezi, F. N., & Belbahri, L. (2022). Screening of cellulolytic bacteria from various ecosystems and their cellulases production under multi-stress conditions. *Catalysts*, *12*(7), 769. https://doi.org/10.3390/catal12070769

Basheer, E., & Salman, E. D. (2017). Enhancing cellulase activity in a novel thermophilic *Bacillus* sp. isolated from Iraqi soil by using chemical and physical mutagens. ResearchGate. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34409.75365

Béguin, P., Millet, J., Chauvaux, S., Salamitou, S., Tokatlidis, K., Navas, J., Fujino, T., Lemaire, M., Raynaud, O., Daniel, M. K., et al. (1992). Bacterial cellulases. *Biochemical Society Transactions, 20*(1), 42-46. https://doi.org/10.1042/bst0200042

Berghem, L. E. R., & Pettersson, L. G. (1974). The mechanism of enzymatic cellulose degradation: Isolation and some properties of a β-glucosidase from *Trichoderma viride*. *European Journal of Biochemistry, 46*(2), 295-305.

Bhati, N., Shreya, & Sharma, A. K. (2021). Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. *Journal of Food Processing and Engineering, 44*(2). https://doi.org/10.1111/jfpe.13623

Bhatia, S. K., Kumar, V., Kumar, V., Bhatia, R. K., & Yang, Y.-H. (2023). Microbial activity and productivity enhancement strategies. *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship* (pp. 85-104). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00004-0

Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J. 2004. Carbohydrate-binding modules: Fine-tuning polysaccharide recognition., *Biochem. J.,* 382 769-781. https://doi.org/10.1042/BJ20040892

Bütüner, D., & Kantarcı, G. (2006). Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Moleküler Biyoloji ve Genetik Dergisi,* 35(2), 149-170. https://doi.org/10.1501/Eczfak_0000000056

Carrard, G., Koivula, A., Söderlund, H., & Béguin, P. (2000). Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97*(19), 10342–10347. https://doi.org/10.1073/pnas.160216697

Chen, L., Duan, L., Sun, M., Yang, Z., Li, H., Hu, K., & Yang, H. (2023). Current trends and insights on EMS mutagenesis application to studies on plant abiotic stress tolerance and development. *Frontiers in Plant Science,* 13. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1052569

Crow, J. F., & Abrahamson, S. (1997). Seventy years ago: Mutation becomes experimental. *Genetics, 147(4),* 1491–1496.

Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules,* 156, 180-185. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.045

Dessalegn, E., & Vassantha, H. P. (2015). *Studies on phenolic contents and biofunctional activities of selected Ethiopian spices and herbs* (Doktora tezi). Addis Ababa University

Doğan, M. 2015. Yünlü kumaşın fiziksel özellikleri üzerine yeni izolat *Bacillus* sp. suşundan elde edilen Proteaz enziminin etkisinin araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Muhendisliği Anabilim Dalı, Bursa.

Doi: 10.5455/jabet.2021.d106

Durland, J., & Ahmadian-Moghadam, H. (2022). *Genetics, Mutagenesis*. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560519/

Ega, S. L., Drendel, G., Petrovski, S., Egidi, E., Franks, A. E., & Muddada, S. (2020). Comparative analysis of structural variations due to genome shuffling of *Bacillus subtilis* VS15 for improved cellulase production. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(4), 1299. https://doi.org/10.3390/ijms21041299

Ejaz, U., Sohail, M., & Ghanemi, A. (2021). Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics*, *6*(3), 44. https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044

Ekmekçi Körlü, A., Duran, K., Bahtiyar, M. İ., & Perinçek, S. (2008). Selülaz enziminin selülozik esaslı kumaşlar üzerine etkisi. *Tekstil ve Konfeksiyon, 1*:41-46.

Fasim, A., More, V. S., & More, S. S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology, 69*, 68-76. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.01.007

Gaur, R. & Tiwari, S. (2015). Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostablealkalophilic cellulase from Bacillus vallismortis RG-07. *BMC Biotechnology*, 15(19): https://doi.org/10.1186/s12896-015-0129-9.

Greim, H. (2024). Ethyl methanesulfonate. In *Encyclopedia of Toxicology* (4th ed.). 4: 503-507. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00245-1

Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Lewontin, R. C., & Carroll, S. B. (2004). *An introduction to genetic analysis* (8th ed.). W.H. Freeman.

Guruk, M., & Karaaslan, M. (2020). Production and Biochemical Characterization of Cellulase Enzyme by Trichoderma Strains from Harran Plain. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, *3*(3), 258-274. https://doi.org/10.38001/ijlsb.756818

Güzel, M., & Akpınar, Ö. (2018). Bakteriyel selülozların üretimi ve özellikleri ile gıda ve gıda dışı uygulamalarda kullanımı. *Akademik Gıda, 16*(2), 241-251. https://doi.org/10.24323/akademik-gida.449633

Haan, R.D., Rose, S.H., Lynd, L.R. & Zyl, W.H. (2007). Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Metabol. Eng.*, 9, 87– 94.

Haq, I., Ali, S., Javed, M. M., Hameed, U., Saleem, A., Adnan, F., & Qadeer, M. A. (2010). Production of alpha amylase from a randomly induced mutant strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application as a desizer in textile industry. *Biotechnology Letters*, *42*(1), 473-484.

Hefferon, K. (2017). Cellulase Production in Transgenic Plants: Molecular Pharming with a Twist. *Advances in Biotechnology & Microbiology*, *6*(2) https://doi.org/10.19080/aibm.2017.06.555685

Heinze, T. (2015). Cellulose: Structure and properties. In T. J. Heinze (Ed.), *Cellulose chemistry and properties: Fibers, nanocelluloses and advanced materials* (pp. 1-52). Springer. https://doi.org/10.1007/12_2015_319

Hon, D. N.-S. (1994). Cellulose: A random walk along its historical path. *Cellulose*, *1*,1-25.

Imran, M., Anwar, Z., Irshad, M., Asad, M. J., & Ashfaq, H. (2016). Cellulase production from species of fungi and bacteria from agricultural wastes and its utilization in industry: A review. *Advances in Enzyme Research, 4*(2), 44-60. https://doi.org/10.4236/aer.2016.42005

Islam, M., Sarkar, P. K., Mohiuddin, A. K. M., & Suzauddula, M. (2019). Optimization of fermentation condition for cellulase enzyme production from *Bacillus* sp. *Malaysian Journal of Halal Research, 2*(2). https://doi.org/10.2478/mjhr-2019-0009

Jankorazov, A. M. o., Xolmamatova, D. A. q., & Murodboyeva, M. M. q. (2023). Enzymes and their industrial application methods. *International Bulletin of Engineering and Technology*. https://internationalbulletins.com/intjour/index.php/ibet/article/view/418

Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019). Microbial cellulases: An overview and application. *Cellulose* (pp. 1–21). Doi: 10.5772/intechopen.84531

Kinuthia, J. M. (2016). Sustainability of wastepaper in construction. In K. P. F. Jin (Ed.), *Sustainability of Construction Materials (Seconda Edition).* pp. 567-596. Woodhead Publishing.

Korsa, G., Konwarh, R., Masi, C., Ayele, A., & Haile, S. (2023). Microbial cellulase production and its potential application for textile industries. *Annals of Microbiology*, *73*(13). https://doi.org/10.1186/s13213-023-01715-w

Krässig, H. A. (1993). Cellulose structure, accessibility and reactivity. Yverdon,Switzerland, Gordon and Beach Science Publishers, 187-199.

Kuhad, R.C., Gupta, R., & Singh, A.D. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*. Doi: 10.4061/2011/280696

Kumar, V., Singh, D., Sangwan, P., & Gill, P.K. (2014). Global market scenario of industrial enzymes. In V. Beniwal & A.K. Sharma (Eds.), Industrial Enzymes (Chapter 10). Nova Science Publishers, Inc. Doi:10.13140/2.1.3599.0083

Kumari, S. U. (2018). Difference between random mutagenesis and site directed mutagenesis. https://www.differencebetween.com/difference-between-random-mutagenesis-and-vs-site-directed-mutagenesis/

Kuokkanen, M., Mäentausta, O. K., & Kuokkanen, T. J. (2018). Eco- and material-efficient utilization applications of biotechnologically modified fiber sludge. *BioResources, 13*(1), 1457-1474. https://doi.org/10.15376/biores.13.1.1457-1474

Kurtoğlu, E. L., & Tekedereli, İ. (2015). Dna Onarım Mekanizmaları. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(3), 169-177.

Kuşaklı, S. (2011). *Bacillus subtilis'in peyniraltı suyu içerisinde fermantasyonu ile polisakkarit ve surfaktin üretiminin araştırılması* (Yüksek lisans tezi). Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.

Labrou, N. E. (2010). Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution. *Current Protein & Peptide Science, 11*(1), 91-100. https://doi.org/10.2174/138920310790274617

Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Meksem, J., Hamilton-Brehm, S. D., Lightfoot, D. A., Meksem, K., & Liang, Y. (2020). EMS-induced mutagenesis of *Clostridium carboxidivorans* for increased atmospheric CO2 reduction efficiency and solvent

production. *Microorganisms*, *8*(8), 1239. https://doi.org/10.3390/microorganisms8081239

Lakhundi, S., Siddiqui, R., Khan, N.A. 2015. Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of Acanthamoeba infections. *Parasites and Vectors*, 8(23). https://doi.org/10.1186/s13071-015-0642-7

Li, C., Lin, F., Li, Y., Wei, W., Wang, H., Qin, L., Zhou, Z., Li, B., Wu, F., Chen, Z. (2016). A β-glucosidase hyper-production *Trichoderma reesei* mutant reveals a potential role of cel3D in cellulase production. *Microb Cell Fact*, *15*(1), 151. doi:10.1186/s12934-016-0550-3

Li, J., Zhou, P., Liu, H., Xiong, C., Lin, J., Xiao, W., Gong, Y., & Liu, Z. (2014). Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, *155*, 258-265. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.113

Lu, Z., Guo, W., & Liu, C. (2018). Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, *80*(3), 427–433. https://doi.org/10.1292/jvms.16-0572

Lugani, Y., Singla, R., Sooch, B.S. 2015. Optimization of cellulase production from newly isolated *Bacillus sp*. Y3. *J. Bioprocess. Biotech.*, 5(11), 264. http://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.1000264

Luo, K., Kim, N., You, S.-M., & Kim, Y.-R. (2019). Colorimetric determination of the activity of starch-debranching enzyme via modified Tollens' reaction. *Nanomaterials*, *9*(9), 1291. https://doi.org/10.3390/nano9091291

Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506–577. doi: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002

Ma, X., Li, S., Tong, X., & Liu, K. (2024). An overview on the current status and future prospects in *Aspergillus* cellulase production. *Environmental Research*, *244*, 117866. https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117866

Malik, W. A., & Javed, S. (2021). Biochemical characterization of cellulase from Bacillus subtilis strain and its effect on digestibility and structural modifications of lignocellulose rich biomass. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.800265

Mandels, M., & Reese, E. T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *Journal of Bacteriology*, *73*(2), 269-278. https://doi.org/10.1128/jb.73.2.269-278.1957

Mesbah, N. M. (2022). Industrial Biotechnology Based on Enzymes From Extreme Environments. Front. Bioeng. Biotechnol. 10, 1-2. doi: 10.3389/fbioe.2022.870083

Michellin Kiruba, N. J., & Joseph Thatheyus, A. (2021). Fungi, fungal enzymes and their potential application as biostimulants. In S. Saravanakumar & M. Samiyappan (Eds.), *Microbiome Stimulants for Crops: Mechanisms and Applications* (ss. 305-314). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822122-8.00024-8

Mohammed, Y., Lee, B., Kang, Z., & Du, G. (2014). Development of a two-step cultivation strategy for the production of vitamin B12 by *Bacillus megaterium*. *Microbial Cell Factories*, *13*, 102. https://doi.org/10.1186/s12934-014-0102-7

Msakni, S., (2020). Türk topraklarından izole edilmiş *Bacillus* sp. suşlarından selülaz enzim üretiminin taranması, besinsel optimizasyon, enzimin kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve yünlü kumaştaki bitki atıklarının giderilmesinde etkinliği. *(Yüksek lisans tezi)*. Bursa Uludağ Üniversitesi, Bursa.

Msakni, S., Elif Demirkan, E., Tanik Aladag N. (2024). Production, Optimization, Partial Purification, and Characterization of a Novel Cellulase from Bacillus subtilis 171ES and Its Potential for Use in Textiles. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 83 (6), 677-687. https://doi.org/10.56042/jsir.v83i6.4165

Mullins, E., Bresson, J.-L., Dalmay, T., Crawford Dewhurst, I., Epstein, M. M., Firbank, L. G., Guerche, P., Hejatko, J., Moreno, F. J., Naegeli, H., Nogue, F., Sanchez Serrano, J. J., Savoini, G., Veromann, E., Veronesi, F., Casacuberta, J., Lenzi, P., Munoz Guajardo, I., Raffaello, T., & Rostoks, N. (2021). *In vivo and in vitro random mutagenesis techniques in plants*. *EFSA Journal*, *19*(10) 6611. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6611

Narasimhan, A., Suresh, S., Bist, D., & Shivakumar, S. (2013). Enhancement of mycolytic activity of an antagonistic *Bacillus subtilis* through ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenesis. *Turkish Journal of Biology*, *37*(3). https://doi.org/10.3906/biy-1209-20

Nisar, K., Abdullah, R., Kaleem, A., Iqtedar, M., Aftab, M., & Saleem, F. (2022). Purification, characterization and thermodynamic analysis of cellulases produced from *Thermomyces dupontii* and its industrial applications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *29*(12). https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103483

Nithya, V., Murthy, P. S. K., & Halami, P. M. (2013). Development and application of active films for food packaging using antibacterial peptide of *Bacillus licheniformis* Me1. *Journal of Applied Microbiology*, *115*(2) 475-483. https://doi.org/10.1111/jam.12258

Niyonzima, F. N. (2021). Detergent-compatible fungal cellulases. *Folia Microbiologica*, *66*(1), 25-40. https://doi.org/10.1007/s12223-020-00838-w

Ömür Bostancı, Ş. (2014). Bazı benzotiyazol türevi bileşiklerin mutajenik potansiyellerinin Ames test sistemi ile belirlenmesi. *Yüksek lisans tezi*. Hacettepe Üniversitesi.

Paloheimo, M., Haarmann, T., Mäkinen, S., & Vehmaanperä, J. (2016). Production of industrial enzymes in *Trichoderma reesei*. In R. Schmoll (Ed.), *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications* (pp. 23-57). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0_2

Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., & Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, *77*(1): 149-162.

Paul, M., Mohapatra, S., Kumar Das Mohapatra, P., & Thatoi, H. (2021). Microbial cellulases -An update towards its surface chemistry, genetic engineering and recovery for its biotechnological potential. *Bioresource Technology*, 340. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125710

Ribeiro, O., Magalhaes, F., Q Aguiar, T., Wiebe, M., Penttila, M., & Domingues, L. (2013). Random and direct mutagenesis to enhance protein secretion in Ashbya gossypii, 4 (5), 322–331. https://doi.org/10.4161/bioe.24653

Robinson, P.K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays Biochem., 59, 1–41. https://doi.org/10.1042/bse0590001

Roopa, R., Charulatha, M., & Meignanalakshmi, S. (2017). Production of cellulase from *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation using fiber wastes of palmyra palm. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6*(6), 2225-2231.

Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I., & Chambliss, G. H. (1998). *Bacillus*. In L. Collier, A. Balows, & M. Sussman (Eds.), *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections: Systematic bacteriology* (9th ed.), 2.Oxford University Press.

Ruaida, A., & Karim, K. M. (2021). Effect of chemical and physical mutagens on amylase producing potentiality of *Aspergillus flavus* NSH9. *J Adv Biotechnol Exp Ther., 4*(1), 53-59.

Rudnik, E. (2012). Compostable polymer materials. In S. Ebnesajjad (Ed.), *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications* (pp. 201-226). William Andrew.

Sadhu, S., Ghosh, P. K., Aditya, G., & Maiti, T. K. (2014). Optimization and strain improvement by mutation for enhanced cellulase production by *Bacillus* sp. (MTCC10046) isolated from cow dung. *Journal of King Saud University-Science, 26*(4), 323-332. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.06.001

Sarıçam, S., & Baylan, M. (2023). Selülaz Enzimi Üreten Bakterilerin İzolasyonu ve Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6(2), 1543-1561.

Schwarz, W.H. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 56, 634–49.

Shaikh, N.M., Patel, A.A., Mehta, S.A., & Patel, N.D. (2013). Isolation and Screening of Cellulolytic Bacteria Inhabiting Different Environment and Optimization of Cellulase Production. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, *3*(1), 39-49.

Shamshad, A., Rashid, M., Jankuloski, L., Ashraf, K., Sultan, K., Alamri, S., Siddiqui, M. H., Munir, T., & Zaman, Q. u. (2023). Effect of ethyl methanesulfonate mediated mutation for enhancing morpho-physio-biochemical and yield contributing traits of fragrant rice. *Plant Biology*. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.00001

Sharma, A., Gupta, G., Ahmad, T., Mansoor, S., & Kaur, B. (2019). Enzyme engineering: Current trends and future perspectives. *Food Reviews International, 37*(2), 121-154. https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1695835

Sheir-Neiss, G., & Montenecourt, B. S. (1984). Characterization of cellulase hyperproducing mutants of *Trichoderma reesei*. *Molecular and General Genetics MGG, 194*(2), 178-185. https://doi.org/10.1007/BF00254645

Shoseyov, O., Shani, Z., & Levy, I. (2006). Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications., *Microbial Mol. Boil. Rev*., 70, 283–95. Doi: 10.1128/MMBR.00028-05

Shyaula, M., Regmi, S., Khadka, D., Poudel, R. C., Dakal, A., Koirala, D., Sijapati, J., Singh, A., & Maharjan, J. (2023). Characterization of Thermostable Cellulase from *Bacillus licheniformis* PANG L Isolated from the Himalayan Soil. *Hindawi International Journal of Microbiology*, https://doi.org/10.1155/2023/3615757

Sikora, P., Chawade, A., Larsson, M., Olsson, J., & Olsson, O. (2011). Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *International Journal of Plant Genomics.* https://doi.org/10.1155/2011/314829

Silber, J. R., Bobola, M. S., Blank, A., & Chamberlain, M. C. (2012). O6-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: Promise and problems. *Biochimica et Biophysica Acta BBA- Reviews on Cancer, 1826*(1), 71-82. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.12.004

Singh R., Kumar M., Mittal A., & Mehta P.K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech.,* 6(2), 174. https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8

Singh, G., Patel, A. K., Gupta, A., Gupta, D., & Mishra V. K. (2019). Current advancements in recombinant technology for ındustrial production of cellulases: part-II. *Fungal Biology*, https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6_11 .

Singh, R., Saati, A. A., Faidah, H., Bantun, F., Jalal, N. A., Haque, S., Rai, A. K., & Srivastava, M. (2023). Prospects of microbial cellulase production using banana peels wastes for antimicrobial applications. *International Journal of Food Microbiology, 388*. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110069

Singh, V. P., & Sharma, D. (2020). Cellulase and its role in industries: A review. *International Journal on Agricultural Sciences, 11*(1), 1-7.

Singhania, R. R., Ruiz, H. A., Awasthi, M. K., Dong, C.-D., Chen, C.-W., & Patel, A. K. (2021). Challenges in cellulase bioprocess for biofuel applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 151*. https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111622

Smant, G., Stokkermans, J. P. W. G., Yan, Y., de Boer, J. M., Baum, T. J., Wang, X., Hussey, R. S., Gommers, F. J., Henrissat, B., Davis, E. L., Helder, J., Schots, A., & Bakker, J. (1998). Endogenous cellulases in animals: Isolation of β-1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95*(8), 4906–4911. Doi: 10.1073/pnas.95.9.4906

Sneath, P. H. A. (1986). Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2, 1104-1139. Williams and Wilkins.

Sriariyanun, M., Tantayotai, P., Yasurin, P., Pornwongthong, P., & Cheenkachorn, K. (2016). Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from Bacillus sp. isolated from rice paddy field soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19, 23-28. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.11.002

Sulyman, A. O., Igunnu, A., & Malomo, S. O. (2020). Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on *Arachis hypogaea* shells. *Heliyon, 6*(12). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05668

Sutaoney, P., Rai, S. N., Sinha, S., Choudhary, R., Gupta, A. K., Singh, S. K., & Banerjee, P. (2024). Current perspective in research and industrial applications of microbial cellulases. *International Journal of Biological Macromolecules, 264*. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130639

Şen, M., Ay, U., Tüzün, E., & Küçükali, C. İ. (2017). Nörodejeneratif hastalıklara DNA onarım mekanizmalarının. *Deneyimsel Tıp Dergisi*, *7*(13), 47-58.

Tachioka, M., Sugimoto, N., Nakamura, A., Sunagawa, N., Ishida, T., Uchiyama, T., Igarashi, K., & Samejima, M. (2016). Development of simple random mutagenesis protocol for the protein expression system in *Pichia pastoris*. *Biotechnology for Biofuels*, *9*(199). https://doi.org/10.1186/s13068-016-0613-z

Tanaka, K., Takanaka, S., & Yoshida, K.-i. (2014). A second-generation *Bacillus* cell factory for rare inositol production. *Bioengineered*, *5*(5), 331-334. https://doi.org/10.4161/bioe.29897

Tang, Z., Lin, X., Yu, M., Yang, J., Li, S., Mondal, A. K., & Wu, H. (2024). A review of cellulose-based catechol-containing functional materials for advanced applications. *International Journal of Biological Macromolecules, 266*, 131243.

Thapa, S., Mishra, J., Arora, N., Mishra, P., Li, H., Hair, J. O., Bhatti, S., & Zhou, S. (2020). Microbial cellulolytic enzymes: Diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 19*, 621-648. https://doi.org/10.1007/s11157-020-09536-y

Todorova, S., & Kozhuharova, L. (2010). Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26*(7), 1207-1216. https://doi.org/10.1007/s11274-009-0290-1

Turnbull, P.C.B. 1996. *Bacillus*: Barron's medical microbiology, Editor: Baron, S. Galveston, Texas.

Vu, V. H. (2012). Improvement of cellulase activity using error-prone rolling circle amplification and site-directed mutagenesis. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 22*(5), 607-613. https://doi.org/10.4014/jmb.1107.07033

Walker, K. W., & King, J. D. (2023). Molecular Aspects of Cell Biology. In Encyclopedia of Cell Biology, 1,161-169.

Wang, J., Hua, B., Wang, X., & Cui, Z. (2017). Characteristics of cellulase in cellulose-degrading bacterium strain Clostridium straminisolvens (CSK1). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *11*(10), 414-421. Doi:10.5897/AJMR2016.8357

Wang, N. S. (2010). *Experiment no. 4A: Glucose assay by dinitrosalicylic colorimetric method*. Department of Chemical & Biomolecular Engineering, University of Maryland.

Waseem, I., Gulsher, M. & Choudhry, S. (2014). Cellulase production from newly isolated bacterial strains from local habitat. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5(8), 1454-1459.

Watanabe, H., & Tokuda, G. 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annu. Rev. Entomol. Annu. Rev.*, 55, 609–632. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085319

Wilson, D. B. (2009). Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*(3), 295-299. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.007

Wood, T.M. (1985). Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochem. Soc. Trans*., 13, 407-410.

Xu, B., Hellman, U., Ersson, B., & Janson, J.C. (2000). Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low

molecular mass endo-b-1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4970–4977. Doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01533.x.

Yan, W., Deng, X. W., Yang, C., & Tang, X. (2021). The genome-wide EMS mutagenesis bias correlates with sequence context and chromatin structure in rice. *Frontiers in Plant Science, 12*. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.579675

Yanar, Y. (2015). Su ürünleri enzimleri ve enzimlerin işleme endüstrisinde kullanım olanakları. *Ege J Fish Aqua Sci* 32(2), 105-113.

Yi, G.-z., Huang, G., Guo, M., Zhang, X., Wang, H., Deng, S., Li, Y., Xiang, W., Chen, Z., Pan, J., Li, Z., Yu, L., Lei, B., Liu, Y., & Qi, S. (2019). Acquired temozolomide resistance in MGMT-deficient glioblastoma cells is associated with regulation of DNA repair by DHC2. *Brain*, *142*(8), 2352–2366. https://doi.org/10.1093/brain/awz202

Zekeya, N., China, C., Mbwana, S., & Mtambo, M. (2019). Dehairing of animal hides and skins by alkaline proteases of *Aspergillus oryzae* for efficient processing to leather products in Tanzania. *African Journal of Biotechnology*, 18(20), 426-434. https://doi.org/10.5897/AJB2019.16752

Zeng, C., Zhao, R., Ma, M., Zeng, Z., & Gong, D. (2017). Mutagenesis and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain for *Cinnamomum camphora* seed kernel oil extraction by aqueous enzymatic method. *AMB Express, 7*, 154. https://doi.org/10.1186/s13568-017-0451-9