OKU Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi
6(2): 1543-1561, 2023

OKU Journal of The Institute of Science and Technology, 6(2): 1543-1561, 2023

Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi

Osmaniye Korkut Ata University Journal of The Institute of Science and Technology

Selülaz Enzimi Üreten Bakterilerin İzolasyonu ve Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Selçuk SARIÇAM[1], Makbule BAYLAN[2*]

[1]Department of Basic Science, Institute of Natural and Applied Sciences, Cukurova University 01250 Adana, Türkiye
[2]Department of Basic Science, Faculty of Fisheries, Cukurova University, 01250 Adana, Türkiye

[1]https://orcid.org/0000-0001-8591-9646
[2]https://orcid.org/0000-0003-0549-0662
*Sorumlu yazar:makyan@cu.edu.tr

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi:
Geliş tarihi: 16.03.2023
Kabul tarihi: 28.04.2023
Online Yayınlanma: 05.07.2023

Anahtar Kelimeler:
Bacillus pasificus
Bacillus tropicus
Selülaz
İzolasyon
Karakterizasyon

ÖZ

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi kampüsünün iki farklı lokasyonundan alınan toprak örneklerinden karboksimetilselülaz (CMCaz) enzimini üreten bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatlar sırasıyla *Bacillus* sp. SU44 ve BK17 olarak isimlendirilmişlerdir. Bu mikroorganizmalardan hücredışı selülaz enzimlerinin kısmi karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada her iki izolata ait enzimin de optimum pH değeri 5,0 ve sıcaklık değeri 40°C olarak belirlenmiştir. *Bacillus* sp. SU44 izolatı maksimum CMCaz üretim seviyesine inokülasyonun başlangıcından itibaren 24. saatte ulaşırken, BK17 izolatı 48. saatte ulaşmıştır. Termal kararlılık deneyleri her iki enzimin de 40°C'den sonra kalan aktivite kaybına uğradığını ortaya koymuştur. CoCl her iki enzim üzerinde de inhibisyon etkisi gösterirken, EDTA, SDS, MgCl ve $CaCl_2$ değişik oranlarda aktivatör olarak rol oynamışlardır. Her iki izolatın da penisilin, ampisilin, gentamisin, tetrasiklin ve siprofloksasin antibiyotiklerine karşı hassasiyet durumları belirlenmiştir. 16S rDNA dizileme analizi *Bacillus* sp. SU44 ve BK17 suşlarının sırası ile *Bacillus pasificus* ve *Bacillus tropicus* ile %99 oranında benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Isolation of Cellulase Enzyme Producing Bacteria and Investigation of Usability in Aquaculture

Research Article

Article History:
Received: 16.03.2023
Accepted: 28.04.2023
Published online: 05.07.2023

Keywords:
Bacillus pasificus
Bacillus tropicus
Cellulase
Isolation
Characterization

ABSTRACT

In this study, bacteria producing carboxymethyl cellulase (CMCase) enzyme were isolated from soil samples taken from two different locations of Çukurova University campus. The isolates were named as *Bacillus* sp. SU44 and BK17, respectively. Partial characterization of the extracellular cellulase enzymes from these microorganisms was performed. In the study, the optimum pH value of the enzyme of both isolates was determined as 5.0 and the temperature value as 40°C. *Bacillus* sp. SU44 isolate reached the maximum CMCase production level at 24 hours from the beginninig of inoculation, while BK17 isolate reached 48 hours. Thermal stability experiments revealed that both enzymes lost residual activity after 40°C. CoCl showed an inhibitory effect on both enzymes, while EDTA, SDS, $MgCl_2$ and $CaCl_2$ acted as activators at different rates. The sensitivities of both isolates according to penicillin, ampicillin, gentamicin, tetracycline and ciprofloxacin antibiotics were determined. 16S rDNA sequencing analysis revealed that *Bacillus* sp. SU44 and BK17 strains showed 99% similarity with *Bacillus pacificus* and *Bacillus tropicus*, respectively.

1. Giriş

Selüloz, yer yüzünde en çok bulunan doğal organik kaynak olup, glukoz molekülünün tekrarlanan ünitelerinden oluşan bitkisel kaynaklı bir karbonhidrattır (Lamed ve Bayer, 1998; Song ve ark., 2019; Purushotham ve ark., 2020). Selüloz fibriler yapıda ve sert bir maddedir. Bitki ve alglerin hücre duvarında bulunmakta ve bitki biyokütlesinin yaklasık %40'ını olusturmaktadır (Niehaus ve ark., 1999; Fernandes ve ark., 2011).

Selülazlar, selüloz polisakkaritlerinin hidrolizine göre endoglukanazlar (endo-β-1,4 glukanaz, CMCaz, endoselülaz), ekzoglukanazlar (sellobiyohidrolazlar) ve β-glukozidazlar olmak üzere 3 ayrı kategoriye ayrılmaktadırlar. Endoglukanazlar, selüloz liflerini rastgele hidroliz ederken, ekzoglukanazlar açığa çıkan lif uçlarını daha küçük parçalar ortaya çıkacak şekilde ayırırlar. β-glukozidazlar ise açığa çıkan bu küçük fragmentleri monomerlerine ayırır (Bayer ve ark., 1998). Bakterilerde selülozom olarak adlandırılan ve birçok selülaz enziminin yer aldığı kompleks yapılar sindirilen maddelerin kolayca hücre içine alınabilmesi için bakteri duvarına bağlı bulunabilirler (Lynd ve ark. 2002). Selüloz bakteriyel kökenli enzimler tarafından hem aerobik hem de anaerobik koşullarda hidrolize edilebilmektedir. Aerobik ortamda selülolitik etki eden mikroorganizmalar arasında *Bacillus, Serratia, Cytophaga, Thermoactinomyces, Herpetosiphon, Sporocytophaga, Sterptomyces, Pseudomonas* sayılabilir. Bunlardan *Bacillus* türleri yüksek selülolitik aktiviteye sahip olup, özellikle *B. subtilis, B. macerans, B. amyloliquefaciencies* ve *B. licheniformis* türleri endüstriyel olarak da kullanılabilen yüksek aktiviteli bakteriler olarak rapor edilmişlerdir (Liming ve Xueliang, 2004; Jayasekara ve Ratnayake, 2019).

Enzimler, katkı maddesi olarak farklı ülkelerde kullanılmaktadır. Besicilikte yem katkı maddesi olarak kullanılan enzimler, mantar ve bakteri kökenlidirler. Bunlardan selülaz, amilaz, fitaz, glukanaz, lipaz, proteaz, ve pektinaz gibi çeşitli enzimler tek başına veya karıştırılarak yem sanayinde kullanılmaktadır. Bu enzimlerin kullanılmasıyla yem sindirimi ve yemden yararlanma oranı artmaktadır (Karademir ve Karademir, 2003).

Selülaz enzimi yem sektöründe sindirimi zor olan selülozu sindirmek için kullanılmaktadır. Kümes hayvanları yetiştiriciliğinde yemlere selülaz enzimi ilavesi hayvanların besin madde değerlendirme performansını artırdığını ortaya koymuştur. Aynı zamanda büyükbaş hayvan yemlerinde selülozdan yararlanma oranını arttırmak amacıyla silaj yapımı sırasında katkı maddesi olarak selülaz enzimi kullanılmaktadır. (Bhat ve Bhat, 1997; Bhat, 2000; Kıran ve ark., 2006; Aygan, 2008). Ridla ve Uchida (1993), silaj ürünlerine eklenen selülaz enzimi sayesinde silajın sindiriminin artırdığını belirtilmişlerdir. Diğer yandan enzim muamelesi rasyonlarda etkili olmasına rağmen yüksek maliyet nedeniyle uygulamada yer bulamamıştır (Atalar ve Çetinkaya, 2017).

Su ürünleri endüstrisinde enzimlerin geleneksel kullanımları balık protein hidrolizatı, balık sosu ve tuzlanmış balık ürünleri gibi ürünlerle sınırlı kalmış olup bu işlemler ise balıktaki endojen proteazlara dayanılarak yapılmıştır (Haard, 1998). Günümüzde ise su ürünleri endüstrisinde balık ve kabuklu enzimlerinin kullanımı çeşitlenmiştir. Geleneksel uygulamalar iyileştirilerek işlem hızı artmış eksojen enzimler ile yeni ürünlerin üretimi gerçekleştirilmiş ve işlem yardımcısı olarak kullanımları söz konusu olmuştur (Haraldsson, 1990; Stefánsson ve Steingrímsdóttir, 1990).

Balık yemi; pamuk tohumu küspesi, mısır gluten unu, kolza, soya küspesi, kanola küspesi ve ay çiçeği tohumu küspesi gibi bitkisel protein kaynaklarından oluşmaktadır (Hendricks ve Bailey, 1989). Bu bitkisel protein kaynakları yüksek düzeyde selüloz içermektedir. Bu nedenle yemden yararlanma oranını artırmak, sindirilmeyen kısımların sindirimini kolaylaştırmak, yem hammaddelerinin enerji değerlerini artırmak için yemlere enzim ilavesi önemli uygulamalardan birisidir (Liang, 2000).

Balık yemlerinin en önemli vazgeçilmez protein kaynağı balık unudur. Çünkü yemlerdeki balık unu büyük ölçüde protein ve dengeli bir amino asit içeriğine sahiptir. Fakat yem üreticileri son zamanlarda balık stoklarındaki azalma nedeniyle balık ununu dışardan ithal etmekte ve bu da ekonomik açıdan bir yük oluşturmaktadır. Dolayısıyla yem üreticileri bitkisel kökenli olan kaynaklara eğilim göstermişlerdir. Bunun nedeni ise ham madde ihtiyacının yüksek düzeyde ve kolay ulaşılabilir olması olup bu durum; selülozun yem sektöründe kaçınılmaz bir yere sahip olmasını sağlamıştır. Protein içeriği yüksek olan bitkisel kaynaklı yemlerde sindirilebilirliği artırmak için de bir çok ülkede enzimler kullanılmaya başlanmıştır (Baylan ve ark., 2015). Sazanlarda (*Cyprinus carpio*) yapılan bir çalışmada, yeme eklenen amilaz, proteaz, β(1,3) glukanaz, β-glukosidaz ve selülaz enzim karışımının balıklarda performans artışına neden olduğu gösterilmiştir (Bogut ve ark., 1995). Selülaz enzimlerinin balık yemi endüstrisinde kullanım potansiyelini araştıran başka bir çalışmada *Aspergillus niger* suşu kullanılarak üretilen selülaz enzimlerinin Nil tilapiası yemlerine ilave edildiğinde sindirimi artırdığını ve bu nedenle yem katkı maddesi olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Abdel-Mohsen ve ark, 2020). Doğadan izole edilen mikroorganizmalardan elde edilen enzimler balıklarda yem iyileştirici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliği ülkemizde hızlı bir gelişme göstermektedir. İşletme karlılığını artırmak ve sağlıklı bireyler yetiştirmek adına enzimler gelecek için umut vericidir. Ancak, ülkemizde sanayi alanında kullanılan enzimler büyük ölçüde ithal edilmektedir. Bu çalışma ile balık yetiştiriciliğinde yem katkı maddesi olarak kullanılabilecek selülaz enzimlerini üreten yeni bakteri suşlarının topraktan izole edilerek enzimler saflaştırılmış ve saflaştırılan bu enzimlerin kısmi karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bacillus sp. İzolasyonu ve Büyüme Ortamı

Çukurova Üniversitesi kampüsünün iki farklı bölgesinden alınan toprak örneklerinden bakteri izolasyonu Lennete ve ark. (1985)'e göre yapılmıştır. Örnekler Luria-Bertani (LB) besi yerlerine (%10 (w/v) tripton, %5 (w/v) maya özütü, %10 (w/v) NaCl, pH 7,5) aktarılarak 37˚C sıcaklıkda 24 saat

süreyle inkübe edilerek anaerobic bakterilere ait sporların çimlenmeleri sağlanmıştır. Tek koloni elde etmek için sıvı besiyerinde üreyen bakteri karışımından örnek alınarak 10^{-6} düzeyine kadar seyreltme yapılmış ve katı besiyerine (%1,5 (w/v) agar) cam çubukla yayma yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. Ertesi gün agar plağında gelişen bakteri kolonileri steril kürdanlarla tek tek toplanarak ileri çalışmalar için boş bir petri kabına aktarılmıştır. İzolatlara ve selülaz enzimlerine ait sonraki bütün çalışmalarda izolatların sıvı ve katı besi yerlerinde üretimi daima tek koloniden aşım yapacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.2. CMCaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İnkübasyon süresi sonunda besiyeri üzerinde gelişen farklı morfolojik görünüşe sahip yaklaşık 80 koloni seçilerek CMC içeren LB-agar (%0,1 (w/v) CMC) plaklarına steril kürdanlarla aktarılmış ve ertesi güne kadar 37°C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Ertesi gün plaklara bakterilerin yüzeyini örtecek şekilde Congo-red (%0,1 w/v) solüsyonu ilave edilmiş ve besiyerinin boyayı absorpsiyonu için oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. Süre sonunda boya solüsyonu dökülerek bu sefer 1M NaCl solüsyonu ilave edilmiş ve 15 dk daha oda sıcaklığında bekletilerek fazla boyanın ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. Süre sonunda NaCl solüsyonu da petri kabından uzaklaştırılmış ve ışıklı pano üzerinde bakteriler fenotipik olarak incelenmiştir. Kırmızıya boyanan zeminde etrafında sarımtırak zon oluşturan koloniler CMCaz pozitif olarak kabul edilmiştir (Özcan, 1992). CMCaz pozitif kolonilerden CMCaz aktivite zon çapları göz önünde bulundurularak iki adet izolat (SU44 ve BK17) ileri çalışmalar için belirlenmiştir.

2.3. Antibiyogram Analizleri

Gece boyunca LB sıvı besi yerinde üreyen izolatlar LB-agar plaklarına cam çubukla, yayma yöntemiyle ekilmiştir. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra petri kaplarına uygun mesafelerde farklı antibiyotikler (gentamisin, ampisilin, tetrasiklin, siprofloksasin ve penisilin) emdirilmiş ticari diskler (Oxoid) yerleştirilmiştir. Plaklar kuruması için 10 dakika kadar kapakları açık bir şekilde steril kabin içerisinde bekletilmiş ve sonrasında ertesi güne kadar 37°C'de inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrası izolatlar, antibiyotik diskinin etrafında üreme olanlar "dirençli", antibiyotiğin yayıldığı belli bir alanda üreme üreme olmaması durumunda (inhibisyon, bakterilerin üremediği dairesel bölge), "hassas" olarak tanımlanmıştır.

2.4. Bakterilerden Süpernatant Eldesi

*Bacillu*s sp. SU44 ve BK17 bakterileri master plaklardan 25 ml hacimli sıvı besi yerlerine ekimleri yapılmış 37°C de orta çalkalama hızında 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün bakteri kültürleri 4900 rpm'de 10 dakika santrifüj (Hettich Universal EBA12) edilerek bakteri hücreleri besi ortamından ayrıştırılmış ve hücredışı enzim karışımını içeren supernatant kısımlar temiz cam kaplara

alınarak enzim analizlerinde kullanılmak üzere buz üzerinde muhafaza edilmişlerdir (Demirkan, 2010).

2.5. Enzim Deneyleri

Enzim analizleri DNS (3,5 dinitrosalisilik asit) (Miller, 1959) yöntemine göre yapılmıştır. LB besiyerinde 37°C'de 24 saat süreyle üretilen bakteriler 4950 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımlar temiz cam kaplara alınarak deneylerde kullanılmak üzere buz üzerinde bekletilmiştir. Reaksiyonlarda tampon olarak sodyum fosfat (Na-fosfat) solüsyonu (50 mM Na_2HPO_4 ve 50 mM NaH_2PO_4 karışımı, pH 7.2) kullanılmıştır. Substrat solüsyonu Na-fosfat buffer ile %2 (w/v) CMC (121°C'de 15 dk otoklavlanır) olacak şekilde hazırlanmıştır. Enzim deneyleri 20 ml'lik cam tüplerde kontrol (2 ml Na-fosfat buffer, 1 paralel), enzim control (EK; 1 ml supernatant + 1 ml Na-fosfat buffer, 5 paralel), substrat control (SK, 1 ml substrat solüsyonu + 1 ml Na-fosfat buffer, 5 paralel) ve enzim-substrat (EK, 1 ml supernatant + 1 ml substrat solüsyonu, 5 paralel) olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon bileşenleri uygun sıcaklık değerine ayarlanmış su banyosunda 30 dk süreyle inkübe edilmişlerdir. Süre sonunda reaksiyon tüpleri su banyosundan uzaklaştırılmış ve reaksiyon bileşenlerinin üzerine 3 ml DNS solusyonu (10 g/L dinitro salisilik asit, 2 g/L fenol, 0,5 g/L sodium sülfit, 200 g/L sodium potasyum tartarat, 500 mL NaOH (%2 w/v) ile çözülür, son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır) eklenerek vortekslenmiştir. Resksiyon bileşenlerini içeren tüpler kaynar su içerisinde 5 dk süreyle bekletilmiş ve oda sıcaklığında soğuduktan sonra OD_{600} nm'de okumaları yapılmıştır (Özcan, 1998). Spektrofotometre okumalarında kontrol grubu kör olarak kullanılmıştır. Kontrol hariç diğer tüm reaksiyon bileşenleri 5 paralel olacak şekilde hazırlanmış ve spektrofotometre okumaları sonucunda bunların ortalamaları alınarak ortalama absorbans değerleri elde edilmiştir. ES ortalamalarından EK ve SK ortalamaları çıkarılarak enzim aktivitelerine bağlı olarak üretilen glukoz miktarını ifade eden absorbans değerleri elde edilmiştir. En yüksek absorbans değeri %100 kabul edilerek, diğer absorbans değerlerinin relatif değerleri hesaplanmıştır. Son olarak bu relatif değerler kullanılarak relatif enzim aktivite grafikleri oluşturulmuştur.

2.6. Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu

İzolatlar tarafından üretilen hücredışı CMCaz enzimlerinin zamana göre enzim aktiviteleri, optimum sıcaklık, sıcaklık direnci ve optimum pH değerleri yukarıda belirtilen protocol uyarınca DNS yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Zamana göre enzim aktivitesinde, bir gün önce LB besiyerine ekimi yapılan ve gece boyunca üreyen bakteri kültürlerinden 100 ml hacimli LB besiyerlerine aşım yapıldığı andan itibaren 24. saatte başlayacak ve 96. saatte tamamlanacak şekilde her 24 saatte bir kültür örneği alınmış ve alınan örneklerdeki enzim aktiviteleri relatif olarak belirlenmiştir.

Enzimlerin optimum düzeyde aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerinin belirlenmesinde, LB sıvı besiyerinde 24 saat süre kültüre alınmış bakterilerden hücre dışı enzimler santrifüj ile elde edilmiş ve 40-90°C sıcaklık değerleri arasında CMCaz aktivite düzeyleri belirlenmiştir. En yüksek aktivite

gösteren sıcaklıkdeğerine ait absorbans değeri %100 olarak Kabul edilmiş ve diğer sıcaklık değerlerindeki aktivite düzeyleri relatif olarak belirlenmiştir.

Enzimlerin bazı metal iyonları ($CaCl_2$, $MgCl_2$, EDTA, SDS, CoCl) varlığında aktivite düzeyler DNS yöntemi ile yukarıda belirtildiği şekilde belirlenmiştir. Her bir kimyasal madde son konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde enzim örneklerinin içine ilave edilmiştir. Herbir kimyasal madde için, kimyasal madde kullanılmayan tüpler kör olarak kullanılmıştır. Kimyasal madde kullanılmayan örnekler %100 kabul edilerek sonuçlar relatif olarak hesaplanmıştır. Enzimlerin sıcaklık optimum değerleri, her bir enzimin substrat ile farklı sıcaklık değerlerinde (40-90°C) 30 dk inkübe edilmesi ile belirlenmiştir. Sonuçlar relatif olarak hesaplanmıştır. En yüksek enzim aktivitesine ait absorbans değeri %100 olarak kabul edilmiş ve diğer sıcaklık değerlerine ait absorbans değerleri relatif olarak belirlenmiştir.

Enzimlerin sıcaklık stabiliteleri, enzimlerin farklı sıcaklık değerlerinde (40-90°C) 15 dk ön inkübasyonu sonucunda substrat ile optimum sıcaklık değerinde 30 dk inkübe edilmesi ile belirlenmiştir. En yüksek absorbans değerine sahip örnek %100 olarak kabul edilmiş ve diğer sıcaklık değerine sahip absorbans değerleri relatif olarak hesaplanmıştır.

Enzimlerin 4,0-11,0 pH değerleri arasındaki aktivite seviyeleri, her bir pH değerinde hazırlanmış bafırlar (pH 4,0-6,0 için 100 mM Na-asetat, pH 6,0-8,0 içim 100 mM Na-fosfat, pH 8,0-11,0 için 100 mM tris) ile hazırlanmış substratlar kullanılarak belirlenmiştir. Reaksiyonlar optimum sıcaklık değerinde 30 dk inkübe edilmiş ve sonuçlar yukarıda belirtildiği şekilde relatif olarak hesaplanmıştır.

2.7. SDS-PAGE Analizleri

SDS-PAGE analizi Laemmli (1970) tarafından belirlenen protokol esas alınarak ve %12'lik jel kullanılarak yapılmıştır. 48 saat süreyle üretilmiş izolatların hücre dışı sıvıları (supernatant) santrifüj ile toplanmış ve 1:1 oranında TCA solüsyonu (%20 w/v) ile muamele edilerek hücre dışı proteinler elde edilmiştir. Örneklerin protein markır (Thermo Fisher Scientific, BP3600500) ile elektroforezinden sonra jel önce 1 saat süreyle Coomassia blue R 250 (%40 (v/v) metanol, %10 (v/v) glasial asetik asit, %50 (v/v) saf su, %0,1 (w/v) Coomassie blue R 250) boyası ile boyanmış, sonrasında destain solüsyonu ile fazla boyanın uzaklaştırılmış ve böylece protein bantları ortaya çıkarılmıştır.

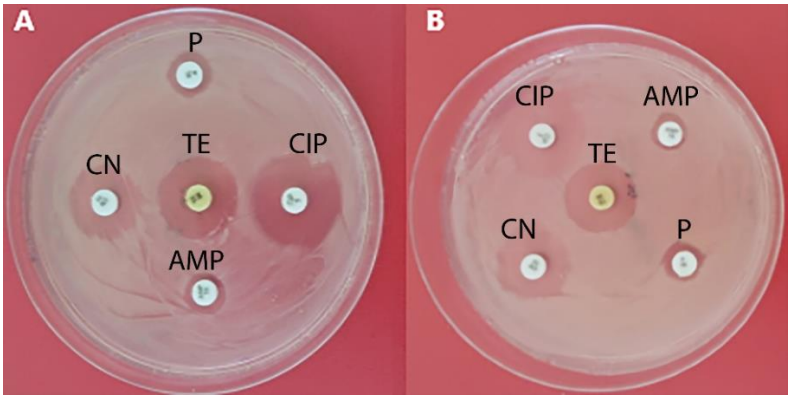
2.8. Filogenetik Analizler

Örneklere ait 16S rDNA, Sanger dizileme hizmet alımı ile Macrogen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 ycle Dizileme Kiti kullanılarak yaptırılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA). 16S rDNA sekanslarının karşılaştırılması MEGA7 programı (https://www.megasoftware.net/) kullanılarak yapılmış ve NCBI GenBank veri tabanından alınan diğer *Bacillus* türleri ile maksimum olabilirlik filogenetik ağacı oluşturulmuştur (Kumar ve ark. 2016).

3. Bulgular

3.1. İzolatların Antibiyogram Analizleri

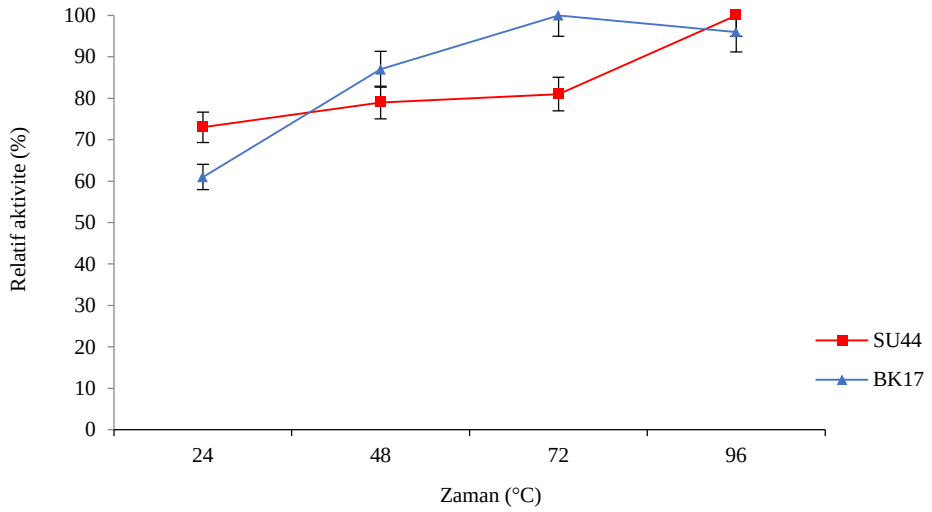
Bacillus sp. SU44 ve BK17 suşlarının gentamisin (CN), ampisilin (AMP), tetrasiklin (TE), siprofloksasin (CIP) ve penisilin (P) antibiyotiklerine karşı hassasiyetleri belirlenmiştir. Antibiyotik disklerinin etrafında meydana gelen zon çapları göz önünde bulundurulduğunda, her iki izolatın da hassasiyet dereceleri yüksekten düşüğe doğru sırasıyla CIP-TE-CN-P-AMP olacak şekilde sıralanmışlardır (Şekil 1).



Şekil 1. *Bacillus* sp. SU44 (A) ve BK17 (B) izolatlarının bazı antibiyotiklere karşı hassasiyet durumları

3.2. Enzimlerinin Zamana Göre Aktivitesi

LB besiyerine bakterilerin inokülasyonundan itibaren 24., 48., 72. ve 96. saatlerde olmak üzere süpernatant (hücre dışı sıvı) numuneleri alınmış ve DNS yöntemiyle zamana göre enzim üretimleri belirlenmiştir. BK17 suşu, üreme periyodunun 72. saatinde en yüksek düzeyde CMCaz üretimini gerçekleştirirken, SU44 suşu ise üreme periyodunun 96. saatinde en yüksek CMCaz üretim seviyesine ulaşmıştır (Şekil 2).

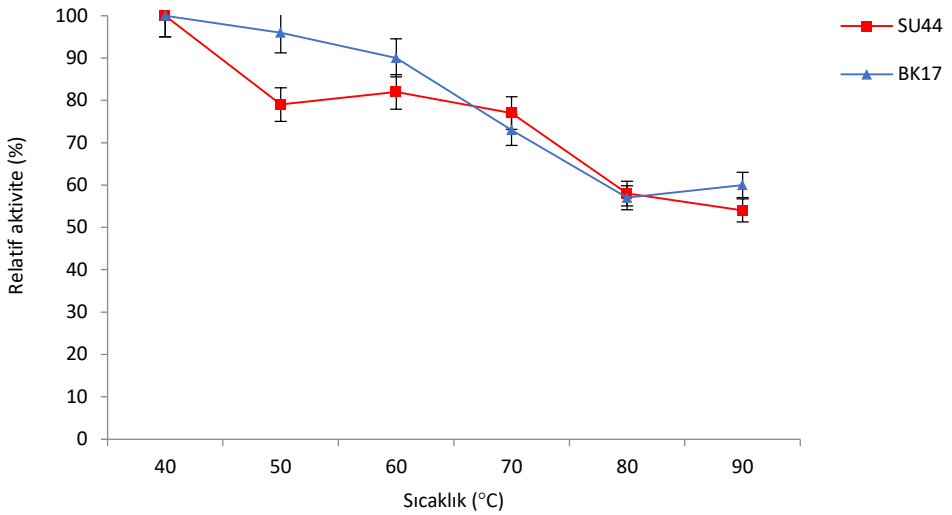


Şekil 1. *Bacillus sp.* SU44 ve *Bacillus sp.* BK17 Suşlarının Zamana Göre CMCaz Üretim Grafiği

Bacillus sp. BK17 bakterisinin inokülasyondan itibaren 24., 48., ve 72. saatlerdeki enzim aktivitesi relatif olarak sırasıyla %73, 79, ve 81 seviyesinde gerçekleşirken, SU44 bakterisinin enzim aktivitesi 24., 48. ve 96. saatlerde sırasıyla %61, 87 ve 96 olarak gerçekleşmiştir.

3.3. Enzim Aktiviteleri İçin Optimum Sıcaklık Değerleri

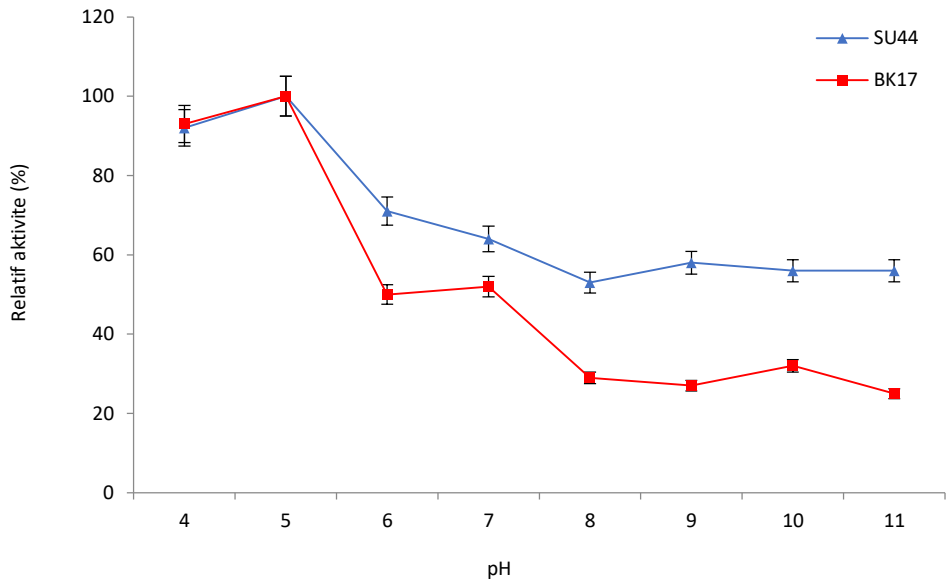
Bacillus sp. BK17 ve *Bacillus* sp. SU44 enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri 40°C olarak belirlenmiştir. *Bacillus* sp. BK17 enzim aktivitesinde 60°C'den sonra belirgin bir azalma meydana gelirken, 90°C'de hafif bir artış gözlenmiştir. *Bacillus* sp. SU44 enzim aktivitesinde ise 50°C'de relatif olarak %21'lik bir aktivite kaybı gözlenirken, aktivite seviyesi 70°C'ye kadar stabil kalmış, sonrasında ise hızlı bir aktivite kaybı meydana gelmiştir (Şekil 3).



Şekil 2. *Bacillus* sp. BK17 ve SU44 CMCaz Enzimlerinin Optimum Sıcaklık Grafiği

3.4.Enzim Aktiviteleri İçin Optimum pH Değerleri

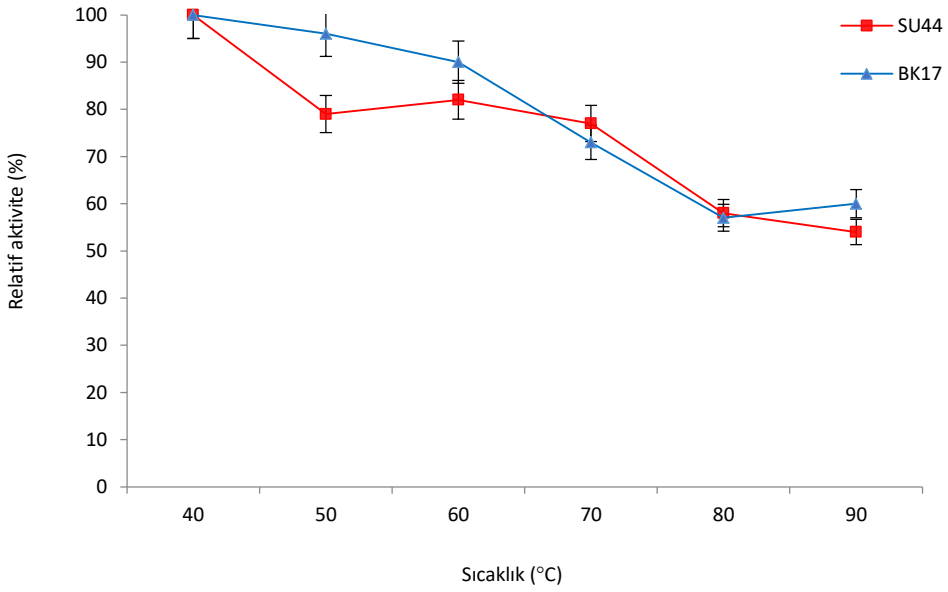
Bacillus sp. BK17 ve *Bacillus* sp. SU44 CMCazları optimum aktivitelerini pH 5,0'de göstermiştir. *Bacillus* sp. BK17 enzimi pH 4,0'de %93 relatif aktivite gösterirken, *Bacillus* sp. SU44 enzimi aynı pH değerinde %92 relatif aktivite göstermiştir. Her iki enzim de pH 6.0'dan itibaren aktivite kaybı göstermiş olup, BK17 enzimi için bu kayıplar pH 6,0 ve 7,0'de sırasıyla %50 ve 48 olarak gerçekleşirken, SU44 enzimi için %29 ve 36 olarak gerçekleşmiştir. Her iki enzim aktivitesi 8,0-11,0 pH değeri arasında stabil kalmış, 11,0 pH değerinde BK17 ve SU44 enzimleri sırasıyla %25 ve 56 oransal aktivite göstermişlerdir (Şekil 4).



Şekil 3. *Bacillus* sp. BK17 ve SU44 CMCaz Enzimlerinin Optimum pH Grafiği

3.5. Enzimlerin Termal Kararlılıkları

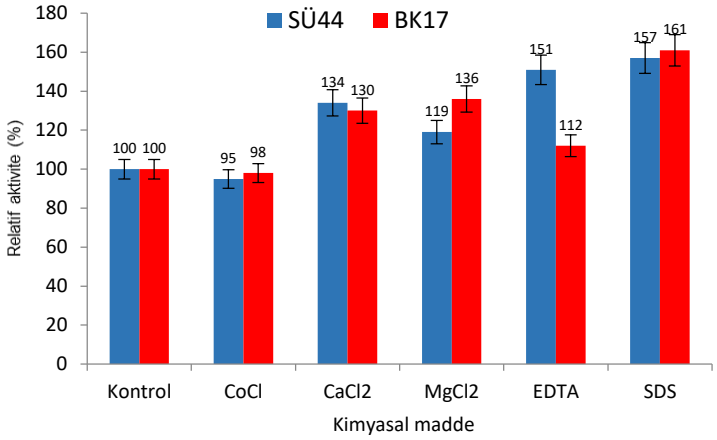
Bacillus sp. BK17 ve *Bacillus sp*. SU44 CMCaz enzimleri 40°C'de 15 dk ön inkübasyon sonucunda aktivitelerini tamamen korumuşlardır. Her iki enzim de 40°C'den sonra kalan aktivite kaybı göstermeye başlamış ve 90°C'de BK17 enzimi %60 kalan aktivite gösterirken, SU44 enzimi %54 kalan aktivite göstermiştir (Şekil 5).



Şekil 4. *Bacillus sp*. BK17 ve *Bacillus sp*. SU44 CMCaz Enzimlerinin Termal Kararlılık Grafiği

3.6. Bazı Kimyasalların Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

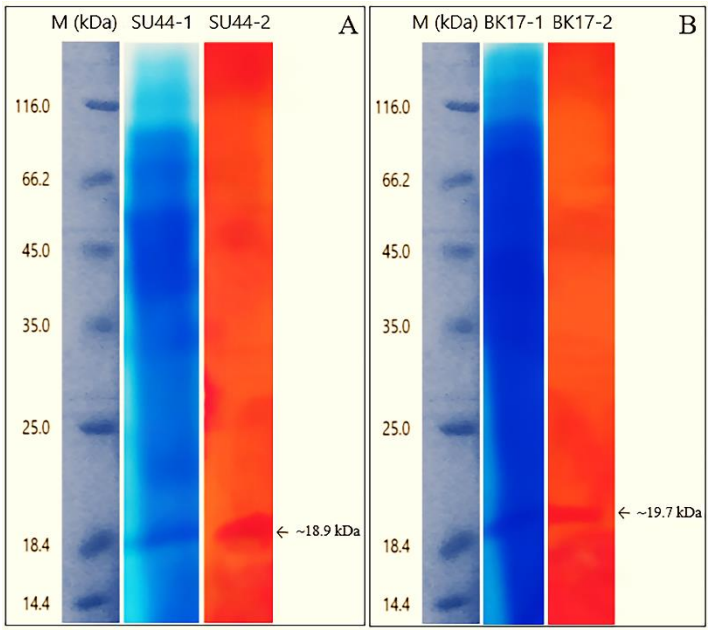
$CaCl_2$, $MgCl_2$, EDTA, SDS, CoCl kimyasallarının *Bacillus* sp. BK17 ve *Bacillus* sp.SU44 CMCaz enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu kimyasal maddelerden $CaCl_2$, $MgCl_2$, EDTA ve SDS her iki enzim üzerinde de farklı oranlarda aktivatör etki gösterirken, bir inorganik kobalt ve klor bileşiği olan CoCl her iki enzim üzerinde de kontrol grubuna göre oldukça düşük seviyelerde (*Bacillus* sp. BK17 enzimi %2, *Bacillus* sp.SU44 enzimi için %5) inhibisyon etkisi göstermiştir. EDTA ve SDS enzimler üzerinde en fazla aktivatör etki gösteren kimyasal maddeler olmuştur. EDTA *Bacillus* sp.SU44 enzim aktivitesini %51 oranında artırırken, SDS *Bacillus* sp. BK17 ve *Bacillus* sp.SU44 enzim aktivitelerini sırasıyla %61 ve %57 oranlarında artırmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Bazı kimyasal maddelerin *Bacillus* sp. BK17 ve SU44 CMCase aktiviteleri üzerine etkisi

3.7. SDS- PAGE ve Zimogram Analizi

Bacillus sp. SU44 ve *Bacillus* sp. BK17 izolatlarının hücre dışı toplam proteinleri SDS-PAGE ile karşılaştırılmış ve her iki selülaz enziminin de moleküler ağırlığı zimogram analizi sonucunda yaklaşık olarak sırasıyla 19,7 kDa ve 18,9 kDa olarak hesaplanmıştır (Şekil 7).



Şekil 7.5 İzolatlara ait toplam proteinlerin SDS-PAGE ile karşılaştırılması ve zimogram analizleri

3.8. Filogenetik Analizler

Çalışmada izole edilen *Bacillus* sp. SU44 ve BK17 bakterilerinin 16S rDNA sekansları sırasıyla Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir.

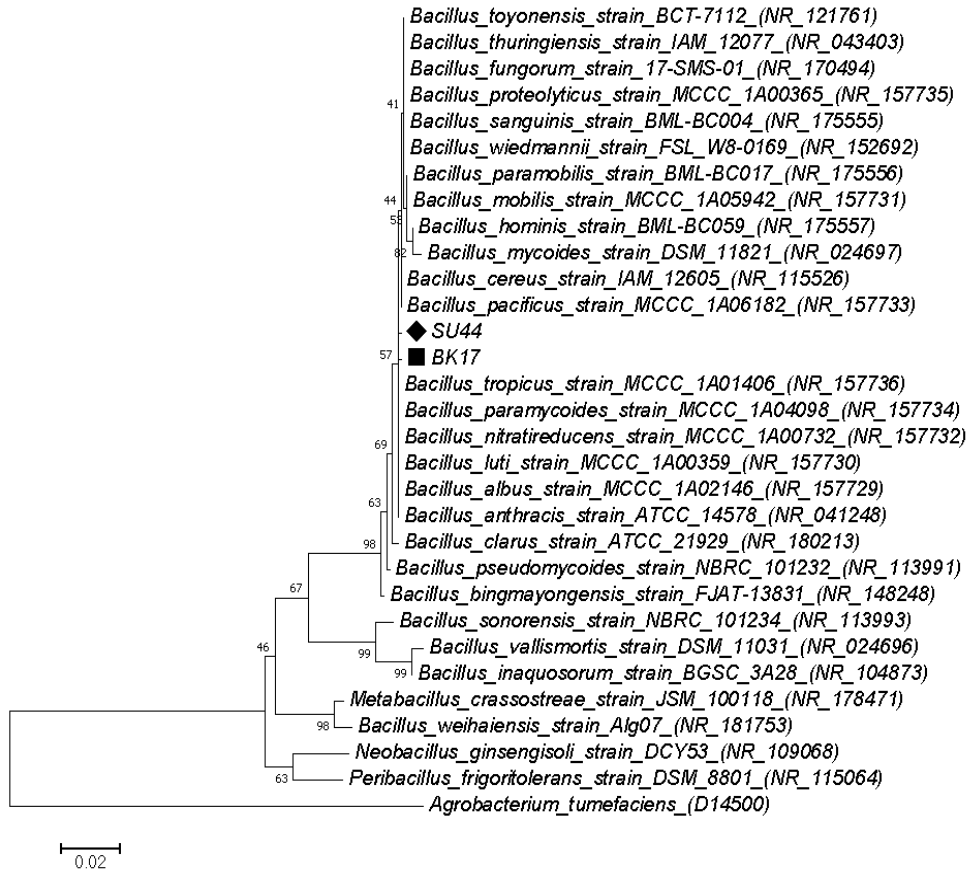
Tablo 1. *Bacillus* sp. SU44 bakterisine ait rDNA sekansı

1	GCTCTTATGA	AGTTAGCGGC	GGACGGGTGA	GTAACACGTG	GGTAACCTGC	CCATAAGACT
61	GGGATAACTC	CGGGAAACCG	GGGCTAATAC	CGGATAACAT	TTTGAACCGC	ATGGTTCGAA
121	ATTGAAAGGC	GGCTTCGGCT	GTCACTTATG	GATGGACCCG	CGTCGCATTA	GCTAGTTGGT
181	GAGGTAACGG	CTCACCAAGG	CAACGATGCG	TAGCCGACCT	GAGAGGGTGA	TCGGCCACAC
241	TGGGACTGAG	ACACGGCCCA	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTAGGGAATC	TTCCGCAATG
301	GACGAAAGTC	TGACGGAGCA	ACGCCGCGTG	AGTGATGAAG	GCTTTCGGGT	CGTAAAACTC
361	TGTTGTTAGG	GAAGAACAAG	TGCTAGTTGA	ATAAGCTGGC	ACCTTGACGG	TACCTAACCA
421	GAAAGCCACG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATA	CGTAGGTGGC	AAGCGTTATC
481	CGGAATTATT	GGGCGTAAAG	CGCGCGCAGG	TGGTTTCTTA	AGTCTGATGT	GAAAGCCCAC
541	GGCTCAACCG	TGGAGGGTCA	TTGGAAACTG	GGAGACTTGA	GTGCAGAAGA	GGAAAGTGGA
601	ATTCCATGTG	TAGCGGTGAA	ATGCGTAGAG	ATATGGAGGA	ACACCAGTGG	CGAAGGCGAC
661	TTTCTGGTCT	GTAACTGACA	CTGAGGCGCG	AAAGCGTGGG	GAGCAAACAG	GATTAGATAC
721	CCTGGTAGTC	CACGCCGTAA	ACGATGAGTG	CTAAGTGTTA	GAGGGTTTCC	GCCCTTTAGT
781	GCTGAAGTTA	ACGCATTAAG	CACTCCGCCT	GGGGAGTACG	GCCGCAAGGC	TGAAACTCAG
841	AGGAATTGAC	GGGGGCCCGC	ACAAGCGGTG	GAGCATGTGG	TTTAATTCGA	AGCAACGCGA
901	AGAACCTTAC	CAGGTCTTGA	CATCCTCTGA	CAACCCTAGA	GATAGGGCTT	CTCCTTCGGG
961	AGCAGAGTGA	CAGGTGGTGC	ATGGTTGTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG
1021	TCC					

Tablo 2. *Bacillus* sp. BK17 bakterisine ait rDNA sekansı

1	GCAAGTCGAG	CGAATGGATT	AAGAGCTTGC	TCTTATGAAG	TTAGCGGCGG	ACGGGTGAGT
61	AACACGTGGG	TAACCTGCCC	ATAAGACTGG	GATAACTCCG	GGAAACCGGG	GCTAATACCG
121	GATAACATTT	TGAACCGCAT	GGTTCGAAAT	TGAAAGGCGG	CTTCGGCTGT	CACTTATGGA
181	TGGACCCGCG	TCGCATTAGC	TAGTTGGTGA	GGTAACGGCT	CACCAAGGCA	ACGATGCGTA
241	GCCGACCTGA	GAGGGTGATC	GGCCACACTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAGA	CTCCTACGGG
301	AGGCAGCAGT	AGGGAATCTT	CCGCAATGGA	CGAAAGTCTG	ACGGAGCAAC	GCCGCGTGAG
361	TGATGAAGGC	TTTCGGGTCG	TAAAACTCTG	TTGTTAGGGA	AGAACAAGTG	CTAGTTGAAT
421	AAGCTGGCAC	CTTGACGGTA	CCTAACCAGA	AAGCCACGGC	TAACTACGTG	CCAGCAGCCG
481	CGGTAATACG	TAGGTGGCAA	GCGTTATCCG	GAATTATTGG	GCGTAAAGCG	CGCGCAGGTG
541	GTTTCTTAAG	TCTGATGTGA	AAGCCCACGG	CTCAACCGTG	GAGGGTCATT	GGAAACTGGG
601	AGACTTGAGT	GCAGAAGAGG	AAAGTGGAAT	TCCATGTGTA	GCGGTGAAAT	GCGTAGAGAT
661	ATGGAGGAAC	ACCAGTGGCG	AAGGCGACTT	TCTGGTCTGT	AACTGACACT	GAGGCGCGAA
721	AGCGTGGGGA	GCAAACAGGA	TTAGATACCC	TGGTAGTCCA	CGCCGTAAAC	GATGAGTGCT
781	AAGTGTTAGA	GGGTTTCCGC	CCTTTAGTGC	TGAAGTTAAC	GCATTAAGCA	CTCCGCCTGG
841	GGAGTACGGC	CGCAAGGCTG	AAACTCAAAG	GAATTGACGG	GGGCCCGCAC	AAGCGGTGGA
901	GCATGTGGTT	TAATTCGAAG	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	GGTCTTGACA	TCCTCTGACA
961	ACCCTAGAGA	TAGGGCTTCT	CCTTCGGGAG	CAGAATGACA	GGTGGTGCAT	GGTTGTCGTC
1021	AGCTCGTGTC	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAACCCTTG	

Bacillus sp. SU44 ve BK17 bakterilerinin rDNA sekans dizilerinin NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanından alınan *Bacillus* cinsine ait 16S rDNA sekans dizileri ile benzerlik düzeyleri karşılaştırılmış ve buna bağlı olarak maksimum olabilirlik metoduna göre oluşturulan moleküler filogenetik ağacı Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. 16S rDNA gen bölgesine ait kısmi dizilere dayalı Kimura-2 parametreli maksimum olabilirlik metoduna (Kimura, 1980) göre oluşturulan moleküler filogenetik ağaç. İlişkili taksonların bir arada kümelendiği tekrarlı ağaçların yüzdeliği dalların yanında gösterilmektedir. Üçgen ve kare sembolleri izolatları göstermektedir. NCBI GenBank veri tabanında belirtildiği şekilde tür adları ve erişim numaraları verilmiştir.

16 S rDNA sanger dizileme analizleri *Bacillus* sp. SU44 ve BK17 16S rDNA sekanslarının sırasıyla *Bacillus pasificus ve Bacillus tropicus* 16S rDNA sekansları ile %99 oranında benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

4. Tartışma

Günümüzde selülazlar birçok mikroorganizma grubu tarafından sentezlenmektedir. Özellikle fungal ve bakteriyel selülazlar endüstriyel kullanımlarından dolayı oldukça önemli bir yere sahiplerdir. Selülaz üretici mikroorganizmalar aerobik veya anaerobik, mezofilik veya termofilik olabilirler (Sang-Mok ve Koo, 2001; Kuhad ve ark., 2011). Bu mikroorganizmalar selülaz enzim komplekslerini, genellikle yüksek protein ürünleri ile birlikte üretmektedirler. Fakat selülaz enziminin düsük spesifik aktivite ve istenmeyen biyokimyasal özellikler taşımaları nedeniyle, selülaz üretiminde bakterilerin kullanılması ile ilgili çalışmaları artırmıştır. Hayvan yemi katkısı olarak ele alındığında, enzim çalışmaları sucul organizmalara göre diğer çiftlik hayvanlarında daha yaygın yapılmaktadır. Bu da su ürünleri yetiştiriciliğinde enzim kullanımı ile ilgili literatür kaynağının kısıtlı seviyede kalmasına sebep olmuştur. Sugumar ve ark. (2020) su ürünleri yetiştiriciliği alanında enzim kullanımı konusunda yeni enzim kaynakları keşfetmek ve değerlendirmek, enzimlerin sindirim sistemi üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak, enzim kullanımının sürdürülebilirliği ve ekonomik açıdan verimliliğini artırmak için fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamıştır. Bu alanda yapılacak olan çalışmaların artırılması, gelişmekte olan bir sektör olan su ürünleri alanında önemli katkılar sağlayacaktır. Bu amaçla Çukurova Üniversitesi kampüs alanında iki farklı bölgeden alınan toprak örneklerinden selülolitik aktiviteye sahip *Bacillus sp*. SU44 ve BK17 bakterilerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Her iki izolata ait selülaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 5 olarak belirlenmiştir. *Bacillus* sp. BK17 enzimi pH 4.0'de %93 relatif aktivite gösterirken, *Bacillus* sp. SU44 enzimi aynı pH değerinde %92 relatif aktivite göstermiştir. Asidik karaktere sahip selülaz enzimlerini üreten bakterilerin izolasyonları başka çalışmalarda da rapor edilmiş olup, bu çalışmalardan birinde Mawadza ve ark. (2000) yaptıkları çalısmada izole ettikleri *Bacillus sp.* CH43 susunun selülaz enziminin optimum pH aralığını 5-7, *Bacillus sp.* HR68 selülazının ise 5-6,5 olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle hayvan yemlerinde yem katkı maddesi olarak kullanımı amaçlandığında, enzimlerin asidik karakter göstermeleri tercih edilebilir bir durumdur. Assefa ve ark. (2020) asidik ve alkalik proteazların Nil Tilapyasının büyüme performansı üzerindeki etkisini incelemişler ve asidik proteazların balık yemi katkı maddesi olarak kullanımı için daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Asidik karaktere sahip yem katkı maddesi enzimler, mide asidine karşı dirençli olacaklarından balıkların sindirim kanalında aktivitelerini optimum seviyelerde ortaya koyabilmektedirler. Bu çalışmada karakterize edilen CMCaz enzimlerinin asidik karakter göstermesi, balık yemi katkı maddesi kullanımı için potansiyel olabileceğini düşündürmektedir.

Bacillus sp. SU44 ve BK17 suşlarının optimum sıcaklıkları 40°C olarak belirlenmiştir. Balıklar poikilotermik yada soğuk kanlı canlılar olup, vücut sıcaklık değerleri içinde bulundukları suyun

sıcaklık değerleri ile aynıdır. Balık yetiştiriciliğinde önemli kültür balıklarının optimum su sıcaklık istekleri türlere göre değişmekle birlikte 10-32°C arasında değişiklik göstermektedir (Dikel, 2009). Bu çalışmada elde edilen CMCaz enzimleri optimum sıcaklık değerlerinden dolayı her ne kadar karasal çiftlik hayvanlarının yemlerinde katkı maddesi olarak kullanımı uygun olmakla birlikte, balık yemi katkısı olarak uygun olmamaktadır. Bununla birlikte klonlama ve hedefe yönelik mutagenez gibi moleküler yöntemlerle bu sorun aşılabilir ve her iki enzim de balık yemi katkı maddesi için uygun hale getirilebilir.

$CaCl_2$, $MgCl_2$, EDTA, SDS, CoCl kimyasallarının *Bacillus* sp. BK17 ve *Bacillus sp.*SU44 CMCaz enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri bir inorganik bir kobalt ve klor bileşiği olan CoCl %98 ve %95 hariç diğer kimyasallarda kontrol grubuna göre değişen oranlarda bir artış gerçekleşmiştir. Selülazlardaki inhibisyon ve aktivasyon özellikleri birçok çalışmada olduğu gibi farklılıklar gösterebilmektedir (Murashima ve ark., 2002; Saha, 2004; Singh ve ark., 2004). Farklı kimyasal malzemelerin etkileri araştırılarak, daha yüksek oranlarda aktivite gösteren kimyasal maddeler belirlenebilir.

Bacillus sp. SU44 ve BK17 suşlarının gentamisin, ampisilin, tetrasiklin, siprofloksasin ve penisilin antibiyotiklerine karşı hassasiyetleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar antibiyotik disklerinin etrafında meydana gelen zon çapları göz önünde bulundurulduğunda, her iki izolatın da hassasiyet dereceleri yüksekten düşüğe doğru sırasıyla CIP-TE-CN-P-AMP olacak şekilde sıralanmışlardır. Kılıçer (2014) yaptığı bir çalışmada kendi izolatları olan *Bacillus* sp. HR-1, HR-2 ve HR-3 izolatlarını antibiyogram testine tabi tutmuş ve her 3 izolatın da amfisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, kanamisin ve penisiline hassas olduğunu bildirmiştir. Mikroorganizmalarda aynı cins, hatta tür düzeyindeki farklı suşlar genomik yapılarına bağlı olarak farklı antibiyogram deseni ortaya koyabilmektedirler. Bu çalışmada ortaya çıkan antibiyogram sonuçlarının diğer çalışmalardaki antibiyogram sonuçları ile benzerlik göstermemesi veya kısmi benzerlik göstermesi bunun en önemli göstergelerindendir. Çalışmamızda *Bacillus* sp. SU44 ve BK17 izolatları için elde edilen antibiyogram sonuçlarının ileride yapılacak olası bir klonma çalışmasında plasmid seçimi için katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Yapılan araştırmalar selülaz enzimlerinin *Bacillus* suşuna göre moleküler ağırlıklarının 16.9 kDa ile 86 kDa arasında değiştiğini göstermektedir. (Hakamada ve ark., 1997; Mawadza ve ark., 2000; Kim ve ark., 2005; Zverava ve ark., 2006; Gaur ve Tiwari, 2015; Nema ve ark., 2015) Çalışmamızda izole edilen *Bacillus* sp. SU44 ve *Bacillus* sp. BK17 izolatlarının selülaz enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak sırasıyla 19,7 kDa ve 18,9 kDa olarak bulunmuştur. Selülaz enzimine ait moleküler ağırlık değeri daha önce yapılmış araştırma verileriyle uygunluk içindedir.

Genomda organizmaların genetik şifrelerinin değişmeyen bölgelerine ait sekanslar kıyaslanarak filogenetik ilişkiler belirlenebilmektedir (Woese ve ark., 1985). Bu sekans bölgeleri bakterilerde rDNA'yı (5S, 16S ve 23S) şifreleyen genler olup taksonomik amaçlar için en çok kullanılan 16S rDNA genlerine ait sekans dizileridir (Harmsen ve Karch, 2004). 16S rDNA'nın filogenetik ilişkilerin

belirlenmesinde önemli rol oynamasının sebebi bakterilerde ortak olarak bulunmasıdır (Woese, 1987). Bu çalışmada da *Bacillus* sp. SU44 ve BK17 bakterilerinin filogenetik ilişkilerini belirlemek için 16S rDNA sekansları kullanılmıştır. *Bacillus* sp. SU44 ve BK17 bakterilerinin dizileri ile NCBI GenBank veri tabanından alınan diğer *Bacillus* türlerinin sekans dizileri seçilerek MEGA7 programında filogenetik ilişki belirlenmiştir. Bu türlerin yakın mikroorganizmalarla benzerlik düzeyleri ortaya konulmuş ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçta *Bacillus* sp. SU44 ve BK17 suşlarının kesinlikle *Bacillus* cinsine ait olduğu aynı zamanda *Bacillus pasificus* ve *Bacillus tropicus* türlerine büyük oranda (%99) benzerlik gösterdiği belirlenmiş olup iki bakteri türününde birbirine çok yakın pozisyonda yer aldığı gözlemlenmiştir (Şekil 8).

5. Sonuç

Bu çalışmada selülaz enzimleri üreten *Bacillus sp.* SU44 ve BK17 suşlarının izole edilerek enzimlerin kısmi karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Her iki enzimin de optimum aktivite gösterdiği pH değeri 5, optimum sıcaklık değeri ise 40°C olarak olarak belirlenmiştir. SU44 ve BK17 bakterilerinin filogenetik ilişkilerini belirlemek için 16S rDNA sekansları kullanılmış ve her iki bakterinin *Bacillus* cinsine ait olduğu aynı zamanda sırası ile *Bacillus pasificus* ve *Bacillus tropicus* türlerine büyük oranda (%99) benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Mikroorganizmaların özellikle tür düzeyinde kesin teşhislerinde 16S rDNA sekans analizi yeterli olmayabilmektedir. Bu çalışmada izole edilen yeni izolatların tür düzeyinde kesin teşhislerinin ortaya konulabilmesi için 16S rDNA sekans analizine ilave olarak diğer moleküler teşhis yöntemlerinin (ör; API 50/CHB testi) yapılması gerekmektedir. Asidik bir pH karakterine sahip olan enzimler hayvan besleme başta olmak üzere bir takın endüstriyel alanlarda kullanım alanı bulabilecektir. Ayrıca enzim genlerinin klonlama ve alan hedefli mutagenez gibi moleküler modifikasyonları endüstriyel üretim ve kullanımlarını arttıracaktır.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından FYL-2021-13600 nolu proje ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırıcıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

References

Abdel-Mohsen AM., Abdel-Razek AM. Cellulase production by Aspergillus niger using waste orange peel and its potential use as an additive in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2020; 29, 101804.

Aydan Atalar A., Çetinkaya N. Samanlarda biyolojik muamelelerle lignoselüloz kompleksin sindirilebilirliğinin artırılması. Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 2017; 5(13): 1720-1725.

Aygan A. Haloalkalofil *Bacillus* sp. izolasyonu; amilaz, selülaz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 186, Adana, 2008.

Assefa AD., Gebru GG., Tadesse A. Evaluation of acid and alkaline proteases on the growth performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Aquaculture Research and Development, 2020; 11(2): 1-7.

Bayer EA., Shimon LJW., Shoham Y., Lamed R. Cellulosomes-structure and ultrastructure. Journal of Structural Biology, 1998;124:221-234.

Baylan M., Mazı G., Gündoğdu S. Balık beslemede biyoteknolojik uygulamalar. Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 2015; 3(3): 112-116.

Bhat MK. Cellulase and related enzymes in biotechnology. Biotechnolgy Advances 2000; 18(5): 355-383.

Bhat MK., Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnology Advances, 1997; 15: 583-620.

Bogut L., Opacak A., Stevic I. The influence of polyzymes added to the food on the growth of carp fingerlings (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture 1995; 129: 252.

Demirkan E. Production, purification, and characterization of α-amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivates. Turkish Journal of Biology 2010; 35: 705-712.

Dikel S. Su sıcaklığının balık yetiştiriciliğine etkisi. Alinteri Journal of Agriculture Science 2009; 16: 42-49.

Fernandes AN., Thomas LH., Altaner CM., Callow P., Forsyth VT., Apperley DC., Kennedy CJ., Jarvis MC. Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011; 108(47): E1195–E1203.

Gaur R., Tiwari S. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostablealkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. BMC Biotechnology 2015; 15(19): 1-12.

Haard NF. Specialty enzymes from marine organisms. Food Technology 1998; 52: 64–67.

Hakamada Y., Koike K., Yoshimatsu T., Mori H., Kobayashi T., Ito S., Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus* sp. KSM-S237. Extremophiles 1997; 1: 151-156.

Haraldsson GG. The applications of lipases for modification of facts and oils, including marine oils. In: Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability, M.N. Voigt, J.R. Botta, (Ed.), Technomic Publishing, Lancaster 1990; 337–357.

Harmsen D., Karch H. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. ASM News 2004; 70: 19–24.

Hendricks KJ., Bailey GS. Adventitues; toxin. Fish nutrition (Second Ed.). Academic Press Inc. New York. USA. 1989; 605-651.

Jayasekara S., Ratnayake R.. Microbial cellulases: An overview and application. Intechopen., 2019; DOI: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84531.

Karademir G., Karademir B. Yem katkı maddesi olarak kullanılan biyoteknolojik ürünler. Lalahan Hayvancılık. Araştırma. Enstitüsü Dergisi 2003; 43(1): 61-74.

Kılıçer HR. Yem katkısı selülaz enzimlerini üreten termofilik *Bacillus* suşlarının izolasyonu ve enzimlerin kısmi karakterizasyonu. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 50, Osmaniye, 2014.

Kim JY., Hur SH., Hong JH. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. HSH810. Biotechnology Letters 2005; 27: 313-316.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 1980; 16(2): 111-120.

Kıran ÖE., Çömelekçioğlu U., Dostbil N. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 2006; 9(1): 12-19.

Kuhad R., Gupta R., Singh A. Microbial cellulases and their industrial applications. Enzyme Research. 2011; Article ID 280696:1-10.

Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 2016; 33(7): 1870-1874.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.

Lamed R., Bayer EA. The cellulosome concept exocellular/extracellular enzyme reactor centers for efficient binding and cellulolysis. SEMS symp 1998; 43, London Academic.

Lennete EH., Ballows A., Hausler JWJR. Shadomy JH. Manuel of Clinical Microbiology. 1985; 4: 1149.

Liang D., Effect of enzyme supplementation on the nutritive value of canola meal for broiler chickens. Master thesis of Department of Animal Science. The University of Manitoba 2000 Canada.

Liming X., Xueliang S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. Bioresource Technology 2004; 91: 259-262.

Lynd LR., Weimer PJ., Van-Zyl., WH., Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2002; 66: 506-577.

Mawadza C., Kaul RH, Zvauya R., Mattiason B. Purification and characterization of cellulases produced by Two *Bacillus* Strains. Journal of Biotechnology 2000; 83: 177-187.

Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 1959; 31: 426- 428.

Murashima K., Nishimura T., Nakamura Y., Kuga J., Moriya T., Simuda N. Purification and characterization of new endo-1, 4-β-D-glucanases from *Rhisopus oryzae*. Enzyme Microbiology Biotechnology. 2002; 30: 319–326.

Nema N., Alamir L., Mohammad M. Partial purification and molecular weight determination of cellulase from *Bacillus cereus*. International Food Research Journal 2016; 23(2): 894-898.

Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M., Antranikian G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. App. Microbiol Biotechnol. 1999; 51: 711-729.

Özcan BD. *Bacillus subtilis*'e ait selülaz genlerinin *E.coli*'de klonlanması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana, 1998.

Özcan N. Cloning and sequencing of a cellulose gene from *Fibrobacter succinoogenes* SD35. Aberdeen Üniversitesi Doktora Tezi, İngiltere, 1992.

Purushotham P., Ho R., Zimmer J. Architecture of a catalytically active homotrimeric plant cellulose synthase complex. Science, 2020; 369(6507): 1089-1094.

Ridla M., Uchida S. The effect of cellulase addition on nutritional and fermentation quality of barley straw silage. Assian-Australasian Journal of Animal Sciences 1993; 6(3): 383-388.

Saha BC. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. Process Biochemistry. 2004; 39: 1871-1876.

Sang-Mok L., Koo YM. Pilot-scale production of cellulose using Trichoderma ressei Rut C-30 in fed-batch mode. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001; 11(2): 229–233.

Singh J., Batra N., Sobti RC. Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2004; 31: 51–56.

Song X., Wang Q., Li L., Li B. Cellulose: Structure and properties. In industrial applications of renewable biomass products (pp. 1-31). 2019; Springer, Singapore.

Stefánsson Stefánsson G., Steingrimsdottir U. Application of enzymes for fish processing in Iceland present and future aspects, In Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability. ed: Voigt M.N., Botta J.R., Technomic Publishing CO Lancaster 1990; 237–250.

Sugumar V., Thirunavukarasu K., Muralisankar T. Enzymes in aquaculture: Current knowledge, challenges, and future perspectives. Aquaculture International, 2020; 28(3): 821-844.

Woese CR. Bacterial evolution. FEMS Microbiology Reviews 1987; 51: 221–271.

Woese CR., Weisburg WG., Hahn CM., Paster BJ., Zablen LB., Lewis BJ., Macke TJ., Ludwig W., Stackebtandt E. The phylogeny of the purple subgroup bacteria: the gamma subdivision. Systematic. and Applied. Microbiology. 1985; 6: 25–33.

Zverava EA., Fedorova TV., Kevbrin VV., Zhilina TN., Rabinovich ML. Cellulase activity of a haloalkaliphilic anaerobic bacterium, strain Z-7026. Extremophiles 2006; 10: 53-60.

Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi (Online)



EISSN: 2687-3729

Web

Editör: Tugay AYASAN

Yayın Formatı: Elektronik

Yayına Başladığı Yıl: 2017

Yıllık Yayın Sayısı: 3

Yayıncı: Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi

Yayın Dili: Türkçe, İngilizce

Dizinlendiği Yıllar: 2020 - 2022 (Fen)

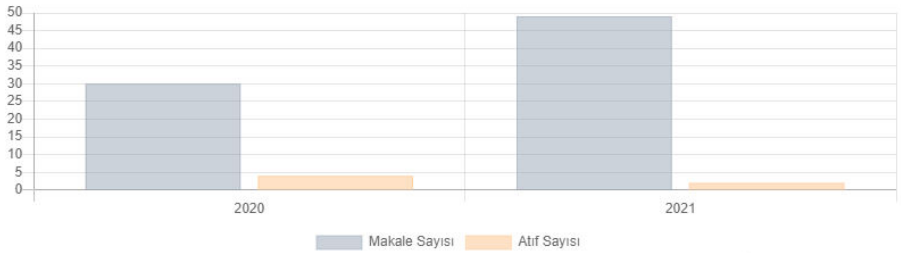
Konu Kategorisi: Fen > Mühendislik | Fen > Tıp | Fen > Temel Bilimler | Fen > Ziraat | Fen > Veterinerlik | Sosyal > Sosyal

Yayın Yapması Gereken Aylar: Mart, Temmuz, Aralık

Konu Alanları: Bilgisayar Bilimleri, Yapay Zeka | Bilgisayar Bilimleri, Sibernitik | Bilgisayar Bilimleri, Bilgi Sistemleri | Mühendislik, Elektrik ve Elektronik | Mühendislik, Deniz *Daha Fazla*

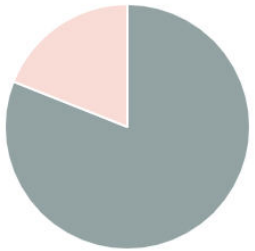
Makale Sayısı	Atıf Sayısı	Kendine Atıf Sayısı	Atıf Alan Makale Sayısı	Atıf Ortalaması	Kendine Atıf Oranı
79	6	2	5	0,08	%0,33

Makale & Atıf Sayısı



"Grafik Verisi" ©2022 - TR Dizin

Makale Türleri



Windows'u Etkinleştir
Windows'u etkinleştirmek için Ayarlar'a gidin.
"Grafik Verisi" ©2022 - TR Dizin