



Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi

Dergiye Geliş Tarihi: 10.12.2014

Yayına Kabul Tarihi: 17.02.2015

Baş Editör: Bilge Hilal ÇADIRCI

Alan Editörü: İskender PARMAKSIZ

Kahramanmaraş Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. P-5 Tarafından Endoglukanaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Ashabil AYGAN^{a,1} (ashabil@ksu.edu.tr)
Gülay BATTALOĞLU^a (gul_ay_65@hotmail.com)

^a Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji
Laboratuvarı, 46100 Kahramanmaraş

Özet – *Bacillus* sp. P-5 bahçe topraklarından izole edilmiştir. Suş, pH 6.0 ile 10.5 arasında enzim sentezi gerçekleştirirken maksimum selüloolitik aktivite 35°C sıcaklıkta pH 8.0 de gözlenmiştir. Enzimin SDS-PAGE analizi ile 66 kDa ağırlığında bir bant elde edilmiştir. P-5 enziminin maksimum aktivitesi pH 6.5 ile pH 8.0 arasında tespit edilmiştir. Maksimum rölatif aktivite ise 55°C’de bulunmuştur. Enzimin 45°C’ye kadar aktivitesinin ortalama %85’ini koruduğu gözlenmiştir. HgCl₂ enzim üzerinde güçlü bir inhibisyon gösterirken diğer kimyasallar ile ciddi bir inhibisyon gözlenmemiştir. Bir çok kimyasala ve deterjanlara dirençli olması kağıt hamuru, deterjan ve biyoetanol üretimi gibi bazı endüstriyel uygulamalar için P-5 endoglukanaz enziminin potansiyeli bir olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler –
Bacillus,
endoglukanaz, CMCase,
saflaştırma,
karakterizasyon

Gaziosmanpaşa Journal of Scientific Research 11 (2015) 11-20

Production, Partial purification and Characterization of Endoglucanase Produced by *Bacillus* sp. P-5 Isolated from K.Maraş Soils

Abstract – *Bacillus* sp. P-5 isolated from orchard soils. The maximum cellulolytic activity was obtained at 35°C, pH 8.0 as the strain showed enzyme synthesis in between pH 6.0-10.5. With the SDS-Page analysis of the enzyme, a single band was obtained around 66 kDa. Maximum activity of the P-5 was obtained in between pH 6.5 and pH 8.0. Maximum relative activity of the enzyme presented was 55°C. Up to 45°C, the enzyme presented a thermostability with an average 85% remaining activity. While HgCl₂ produced a strong inhibition on enzyme, the other chemicals did not produced a serious inhibition. The resistance to detergents and some chemicals makes P-5 endoglucanase potential tool for paper pulp, detergent and bipethanol production industries.

Keywords –
Bacillus,
endoglukanaz, CMCase,
purification,
characterization

Received: 10.12.2015

Accepted: 17.02.2015

¹ Sorumlu Yazar

1. Giriş

Selüloz dünyada en bol bulunan ve yenilenebilir bir biyolojik polimerdir (Juhasz vd., 2005). Her ne kadar β -1,4 bağları ile bağlanmış D-glukoz birimlerinden oluşan bir homopolimer olsa da glukoza tam dönüşümü için en az 3 farklı enzim gerekir. Bunlar endo-1,4- β -glukanaz (EC. 3.2.1.4), ekzo-1,4- β -glukanaz (E.C 3.2.1.91) ve β -glukozidazdır (EC 3.2.1.21) (Wood, 1989). Bunlardan endoglukanazlar, büyük selüloz moleküllerini rastgele daha küçük parçalara keserken selüloz uzunluğu çok kısa sürede indirgenmektedir. Ekzoglukanazlar ise selülozu indirgen olmayan ucundan sellobiyoz üniteleri halinde keser ancak zincir uzunluğunda ani değişimler çok yavaş olur. β -glukozidaz enzimi ise oluşan sellobiyoz birimlerini glukoza parçalarlar.

Selülazların en yaygın kullanımı tekstil endüstrisinde olup büyük oranlarda pamuk ürünlerinden elde edilen ürünlerde yumuşaklık kazandırılması için fazlalık olan liflerin giderilmesi ve deterjan katkı maddesi olmasıdır (Kang vd., 2007). Ayrıca sindirimin ve besinsel kalitenin artırılması için hayvan beslemede de kullanılırken (Tolan ve Foody, 1999) kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde hamurun çözünmesinde atık su arıtımında ve hurda kağıtların boya gideriminde kullanımı son zamanlarda önemli uygulama alanları olmuştur (Kang vd., 2004). Son yıllarda yakıt kaynaklarındaki yetersizlikten dolayı lignoselülozik malzemelerin biyoetanole dönüşümü ilgi odağı olmuştur (Jorgensen ve Olsson, 2006). Lignoselülozik materyallerin monomer şekerlerine dönüştürülmesi ile etanol, laktik asit ve hidrojen gibi bir çok biyoteknolojik ürünlerin üretimi için kaynak oluşturmaktadır (Juhasz vd., 2005). Endüstriyel ihtiyacı karşılayabilecek enzim kaynaklarının başında kısa fermentasyon süresi ve büyük ölçekli üretim bakımından mikroorganizmalar yer almaktadır (Gupta vd., 2003). Mikroorganizmalar içerisinde ise *Bacillus* cinsi bakteriler ekstrasellüler sekresyon yapımları ve genellikle de güvenli kabul edilmelerinden dolayı potansiyel bir endüstriyel enstrümandır (Schallmey vd., 2004).

Bakteriyel selülazların çoğu *Bacillus*'lar tarafından üretilmekte olup çoğu alkalın tabiatlıdır. Ancak nötral pH'da da üreyebilen fakültatif alkalifilikler nötral topraklardan da izole edilebilmektedir. Bu tür mikroorganizmaların enzimlerinin ise geniş bir pH optimumuna sahip olmaları, enzimlerinin de endüstride yaygın bir kullanım spektrumu olabilecektir.

Bu çalışmada, Kahramanmaraş'ın farklı bölgelerinden alınan toprak örneklerinden β -1,4-glukanaz enzimi üreticisi *Bacillus* sp. P-5 izolasyonu yapılmış ve enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen enzimin ise saflaştırılması ve biyokimyasal özellikleri belirlenerek kısmi karakterizasyonu yapılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Kültür Şartları ve Mikroorganizma

Bacillus sp P-5 suşu Kahramanmaraş'ın kırsal alan topraklarından alınan örneklerden izole edilmiştir. Toprak örnekleri distile su ile karıştırıldıktan sonra (1:10 g/mL) 10 dk su banyosunda pastörize edilerek LB Agar (pH 8.0) üzerine yayılmıştır. Bu şekilde 37°C'de izole edilen sporlu bakteriler, pepton 5, KH₂PO₄ 1, NaCl 10% (w/v), maya ekstraktı 5, CMC 10, agar agar 20 (g/L) içeren CMC-agar petriplerde (Singh vd., 2001) karboksimetilselülaz (CMCaz) üretenler taranmıştır. Tarama, % 0.1'lik Kongo kırmızısı (Voget vd., 2006) çözeltisi ile yapılmış ve selüloolitik aktivitesi (R/r) yüksek olan suşlar (Bernhardsdotter vd., 2005) daha sonra kullanılmak üzere eğik katı besiyerlerinde daha sonraki işlemler için +4°C'de saklanmıştır. Enzim kaynağı olarak kullanılacak suşun koloni

morfolojisi ve katalaz testlerinin yanı sıra gram boyama, spor boyama, hareketlilik testleri yapılmıştır (Ratanakhanokchai vd., 1999).

2.2. Enzim Üretimi

Bacillus sp. P-5 suşu, endo- β -1,4-glukanaz enzimi üretmek amacıyla pH'sı 8.0 olan %1'lik CMC (karboksimetilselüloz) içeren CEPM besiyerinde (Na_2HPO_4 1.18 , KH_2PO_4 0.3, NaNO_3 1, KCl 0.5 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 , Maya Ekstraktı 0.5, Kazein Hidrolizatı 0.5 g/L), kültürü yapılmıştır (Krishna, 1999). Logaritmik faz takibi yapılarak iki gece 36°C 'de 250 rpm'de inkübe edilen kültürden bakteri hücreleri $+4^\circ\text{C}$ 'de Hettich Mikro 22R sentrifüjde 4020 g'de 30 dk santrifüjlenerek uzaklaştırılmıştır. Süpernatant, saflaştırma işlemleri için enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

2.3. Enzim Saflaştırılması

Hücrelerin uzaklaştırılmasından sonra süpernatanta $+4^\circ\text{C}$ 'de amonyum sülfat kristalleri %90'a kadar doygunluğa ulaşmaya kadar eklenerek proteinlerin presipitasyonu sağlanmıştır. Oluşan presipitatlar 4-6 saat sonra 4020 g'de $+4^\circ\text{C}$, 30 dk santrifüjle toplanmış ve farklı amonyum sülfat presipitasyonlarında toplanan presipitatlar pH 7.6'daki 100 mM fosfat (Burhan vd., 2003) tamponunda çözülerek aynı tampona karşı bir gece diyaliz (MWCO > 14 000 Da) edilmiştir. Enzim varlığının kontrolü ve tespiti için tuzdan arındırılan fraksiyonlar CMC-agar petrilere damlatılarak bir ön tarama yapılmıştır.

2.4. Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi

Endoglukanaz enziminin moleküler ağırlığı %10'luk SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ile belirlenmiştir. Marker olarak, domuz miyozini (200 kDa), *E. coli* β -Galaktosidazı (116 kDa), tavşan kası fosforilazı b (97 kDa), sığır albümini (66 kDa), ovalbumin (45 kDa) ve sığır eritrosit karbonik anhidrazı (29 kDa) içeren SDS6H2 (SIGMA) protein karışımından faydalanılmıştır. Elektroforez sonrası protein bantları Coomassie brilliant R-250 ile görünür hale getirilmiştir.

Enzimin zimogram analizi de %1'lik CMC içeren SDS-PAGE ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrası jel ikiye bölünerek bir kısmı SDS boyaması için kullanılırken diğer kısmı renatürasyon (Saul vd., 1990) için kullanılmıştır. Renatürasyon sonrası jel plastik saklama kabı içerisinde 36°C 'de 4-6 saat inkübasyona bırakılmış ve enzim aktivite bantları sırasıyla %0.1'lik Kongo kırmızısı solüsyonunda 1 saat ve 1 M NaCl ile 15 dk bekletildikten sonra görünür hale getirilmiştir (Aygan ve Arikan, 2008).

2.5. Enzim Aktivite İşlemleri

Endoglukanaz aktivite çalışmaları eşit miktardaki enzimden Na-fosfat tamponu içerisindeki %1'lik CMC içeren substrata ilave edilerek 55°C 'de 30 dk inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 3,5-dinitrosalisilik asit ilavesi sonrası 5 dk kaynatılarak sonlandırılmış ve 550 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir (Perkin Elmer Lambda EZ 150). Enzim aktivitesinin bir ünitesi standart enzim şartları altında dakikada 1 μmol indirgenmiş şekeri açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.6 Sıcaklık-pH'nın ve Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Enzim Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine Etkisi

Endoglukanaz aktivitesinin optimum pH ve sıcaklık değerleri pH 5.0-10.0 arasında ve 4-75°C sıcaklıklar arasında çalışılarak belirlenmiştir. Bunun için 100 mM konsantrasyonlarındaki Sitrat tamponu (pH 5.0-5.5), Sodyum fosfat (pH 6.0-7.5), Tris (pH 8.0-9.0) ve Boraks-NaOH (pH 9.5-10.0) tamponu kullanılmıştır. Enzimin sıcaklık stabilitesi ise 20-70°C arasında optimum pH'da 15 ve 30 dk'lık ön inkübasyon sonrası belirlenmiştir. Diğer taraftan pH stabilitesi ise enzimin optimum sıcaklıkta pH 5-10 arasındaki farklı pH'larda ön inkübasyonu ile gerçekleştirilmiştir.

Enzime NaCl'ün 0.5 ile 4.0 M arasında değişen konsantrasyonlarındaki etkisi de test edilmiştir. Bütün bu işlemlerden sonra kalan aktiviteler standart enzim aktivitesi tayini ile belirlenmiştir. Denemeler 3'lü tekrarlar şeklinde yapıp ortalamaları alınmıştır.

2.7. İnhibitör, Şelatör, Metal İyonları ve Deterjanların Enzim Üzerine Etkisi

Metaller, şelatör, deterjan ve inhibitör gibi kimyasalların endoglukanaz üzerine etkisi farklı konsantrasyonlarda optimum sıcaklık ve pH'daki ön inkübasyonu ile belirlenmiştir. Bunun için 10 mM MnCl₂, HgCl₂, CaCl₂, MgCl₂, FeCl₃, NiCl₂, CuCl₂, 10 mM Sodyum Azid, EDTA, 1,10-Phenanthrolin monohidrat, Na₂SO₃ ve %1'lik Triton-X 114 ile %3'lük SDS kullanılmıştır.

2.8. Enziminin Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

pH 7.5'deki % 0.1, % 0.5, % 1.0, % 2.0, % 4.0 konsantrasyonlarda CMC substratları ile enzim bire bir oranlarda karıştırılarak optimum aktivite sıcaklıkta 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda reaksiyon DNS ilavesi ile sonlandırılarak enzimatik aktivitenin en yüksek olduğu konsantrasyon spektrofotometrede okunarak belirlenmiştir.

2.9. Enzimin Son Ürünlerinin Kromatografik Analizi

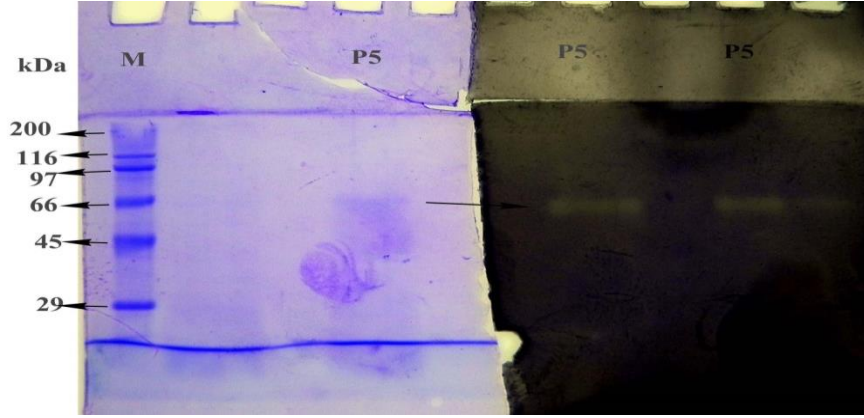
Endoglukanaz P-5 enzimi CMC (%1) substratı ile 55°C'de optimum pH'da 2 saatlik inkübasyona bırakılmış ve enzim son ürünleri alüminyum silika plakalar (Merck- 60 (GF₂₅₄) üzerine 5 µL uygulayarak kloroform-asetik asit-distile su (6:7:1, v/v/v) ile kromatografisi gerçekleştirilmiştir. Oluşan ürünler ise aseton içerisinde hazırlanmış anilin (%1 v/v), difenilamin (%1 w/v), ortofosforik asit (%10 v/v) karışımından püskürtüldükten sonra 160°C de 30 dk bekletilerek görünür hale getirilmiştir (Singh vd., 2004).

3. Bulgular ve Tartışma

Farklı bölgelerden temin edilen toprak örneklerinden toplam 285 suş izolasyonu yapılmış ve bunlardan en yüksek selüloolitik aktivite gösteren *Bacillus* sp. P-5 suşu enzim üreticisi olarak seçilmiştir. P-5 no'lu suş büyük, beyaz ve dalgalı kenarlı koloni morfolojisinde olup aerobik büyüme göstermektedir. Suş ayrıca gram pozitif, çubuk formunda, sporlu, hareketli, katalaz pozitif bir özellik sergilemiştir. *Bacillus* sp. P-5 petri çalışmalarında pH 6.0 ile 10.5 ve 30 ile 40°C arasında üreme ve enzim sentezlerken maksimum selüloolitik aktivite (R/r) pH 8.0 de ve 35°C'de gözlenmiştir.

3.1. Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi

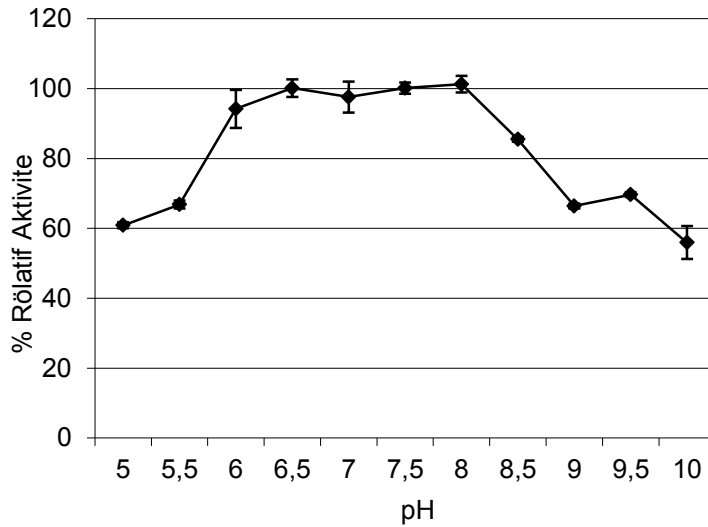
Moleküler ağırlık ve zimogram analizi %1'lik CMC içeren %10'luk SDS-PAGE ile belirlenmiştir (Fotoğraf 1). Endo β - 1-4 glukanaaz P-5 enziminin moleküler büyüklüğü 66 kDa olarak tahmin edilmiştir. Zimogram analizi için elektroforez sonrası renatürasyon solüsyonlarından geçirilen jel kongo kırmızısı ile boyanıp ve NaCl ile muamele edildikten sonra distile su içerisinde iken 10 mM'lık Sitrik asit çözeltisi ilave edilerek jelde koyulaşma sağlanarak enzim aktivite zonları daha belirgin hale getirilmiştir (Fotoğraf 1). P-5 endoglukanazı gibi *Bacillus*'lardan elde edilen diğer bir çok endoglukanaz enzimlerinin moleküler büyüklüğü bir çok araştırmacının bulguları ile benzerlik göstermektedir (Endo vd., 2001; Ariffin vd., 2006; Balasubramanian vd, 2012; Aygan ve Arıkan, 2008).



Fotoğraf 1: *Bacillus* sp. P-5'ün Endo β - 1-4 glukanaaz enziminin SDS-Page ve zimogram analizi. M: Marker (Sigma SDS6H2).

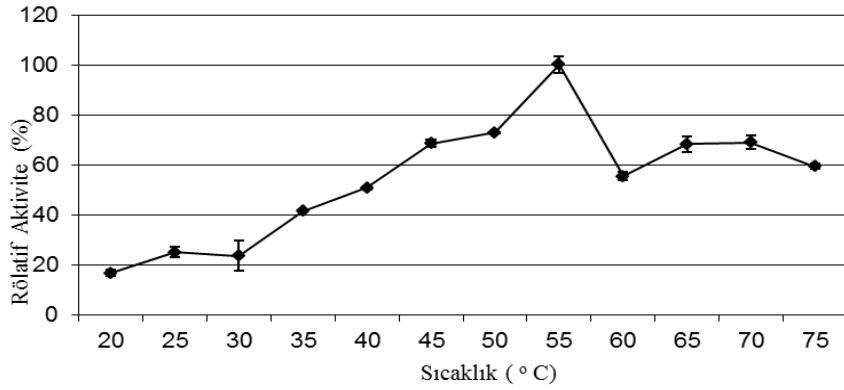
3.2. Endo β - 1-4 Glukanaz Enziminin Özellikleri

Dört farklı tampon sistemi kullanılarak gerçekleştirilen β -1-4 glukanaaz P-5 enziminin maksimum aktivitesi pH 6.5 ile pH 8.0 arasında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1). Diğer çalışmalar için enzimin optimum pH'sının 7.5 olarak kullanılması kararlaştırılmıştır. Enzim pH 6.0 ile 8.0 arasında %90'ın üzerinde rölatif aktivite sergilemiştir.

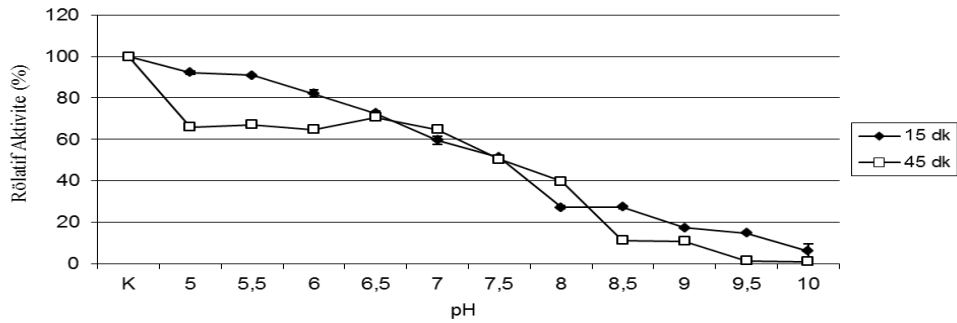


Şekil 1: *Bacillus* sp. P-5'in Endo β - 1-4 glukanaaz enziminin optimum pH'sı.

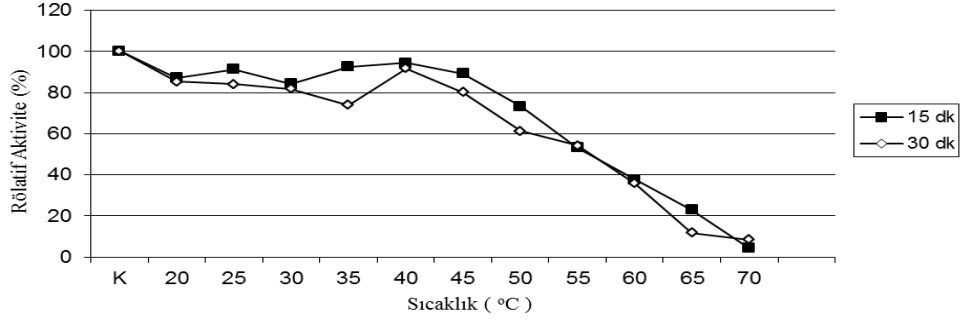
Enzimin maksimum rölatif aktivite sergilediği sıcaklık ise 55°C'dir (Şekil 2). Bu sıcaklık 50 ila 65°C arasında optimum aktivite gösteren bir çok nötr endoglukanazlar ile uyum içerisinde (Mawadza vd.,2000; Ariffin vd.,2006; Lee vd.,2008; Yin vd.,2010; Balasubramanian vd.,2012). Aktivitedeki %50'lik orana ancak 40°C sıcaklıktan sonra ulaşılmıştır. Enzim 35°C ile 60°C arasında ortalama %65 rölatif aktivite göstermiştir. Enzim düşük pH'larda ise daha stabil bir tablo elde edilmiştir (Şekil 3). Enzim pH 7.5'e kadar %50'nin üzerinde kalan aktivite ile pH stabilitesi sergilerken sıcaklık stabilitesi ise 45°C'ye kadar %80 üzerinde seyretmiştir. Termal stabilite için enzim 20-70°C arasında pH 7.5'de 15 ve 30 dk'lık bir ön inkübasyona bırakılmış ve kalan aktivite ölçümü yapılmıştır. Enzim 45°C'ye kadar ortalama %85 kalan aktiviteyi bir termal stabilite sergilemiştir (Şekil 4). Kalan aktivite 55°C'den sonra ancak %50'nin altına düşmüştür. Bu ise mezofilik bir çok reaksiyon için enzimin uygun olduğunu göstermektedir. NaCl'ün enzim üzerine etkisi ise 0.5-4.0 M arasında değişen konsantrasyonlarda denenmiş ve en yüksek kalan aktivite 2.0 M ile elde edilmiştir. 4.0 M konsantrasyondaki tuz ise enzimde %80 aktivite kaybına neden olmuştur (Şekil 5). P-5 Endoglukanaz enzimi halofilik bir karakter göstermemektedir. Çünkü halofilik enzimler 2 M'dan daha az olan NaCl ve KCl konsantrasyonlarında genellikle inaktiftir (Madern vd., 2000). Aktivitenin 2 M'daki artışı ise enzimin tuz varlığındaki çözünürlüğünün artması ile ilişkilendirilebilir.



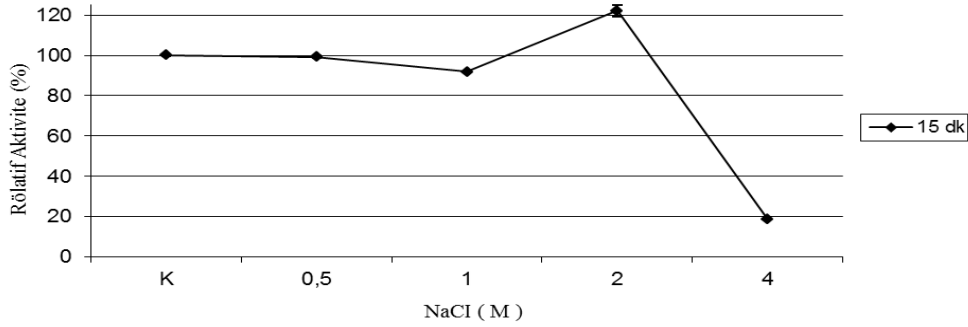
Şekil 2: Endo β-1-4 Glukanaz P-5 enziminin optimum aktivite sıcaklığı.



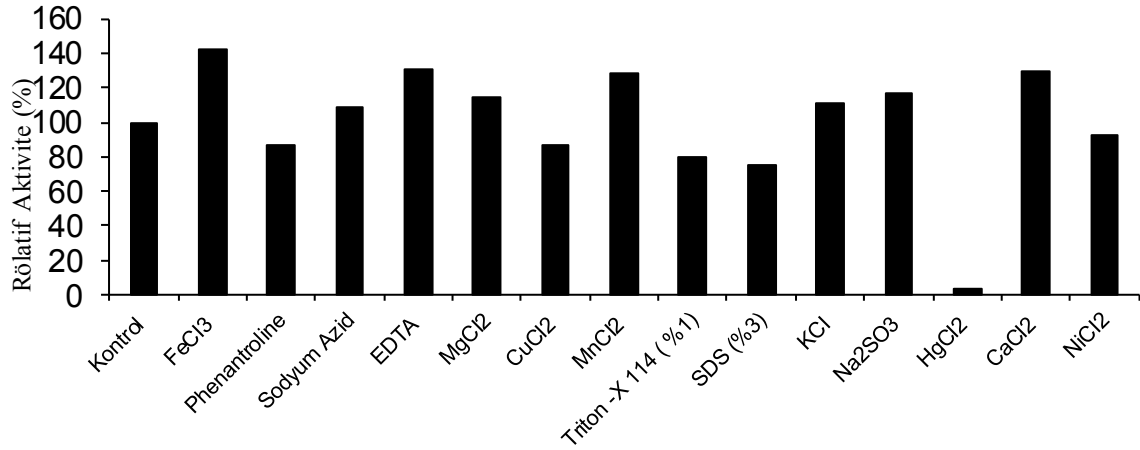
Şekil 3: Endo β-1-4 Glukanaz P-5 enziminin pH stabilitesi.



Şekil 4: Endo β- 1-4 Glukanaz P-5 enziminin sıcaklık stabilitesi.



Şekil 5: Endo β- 1-4 Glukanaz P-5 enzimi üzerine NaCl'in etkisi

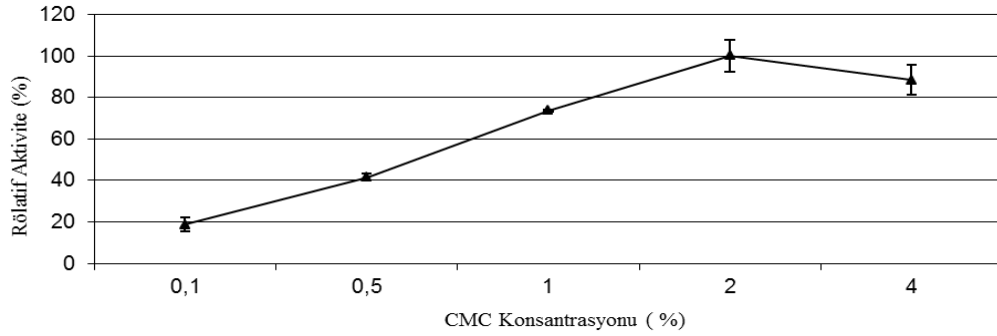


Şekil 6: Bazı kimyasal maddelerin enzim üzerine etkisi

Endo β- 1-4 Glukanaz P-5 enzimi 10 mM oranda FeCl₃, 1,10-Phenantroline, Sodyum azide, EDTA, MgCl₂, CuCl₂, MnCl₂, KCl, Na₂SO₃, HgCl₂, CaCl₂, NiCl₂; %1 Triton X-114 ve %3 oranında SDS ile pH 7.5'de 30 dk inkübe edilerek kalan aktiviteleri test edilmiştir. Enzim HgCl₂ ile güçlü bir şekilde inhibe olurken diğer kimyasallar ile ciddi bir inhibisyon gözlenmemiştir. Aksine FeCl₃, Sodyum azide, EDTA, MgCl₂, MnCl₂, KCl, Na₂SO₃, CaCl₂ varlığında artmış bir enzimatik aktivite tespit edilmiştir (Şekil 6). Deterjanlardan %3'lük SDS ile kalan aktivitenin %75 olması ise enzimin deterjan endüstrisi içinde

kullanılabilirliğini ortaya koymuştur. Diğer yandan +2 değerlikli metal şelatörü olan Phenantrolin ve EDTA ile enzimin inhibe olmaması bir metallo enzim olmadığını gösterirken Mg, Mn ve Ca enzim aktivitesinde artışa sebep olmuştur. Selülozlardaki inhibisyon ve aktivasyon özellikleri birçok çalışmada olduğu gibi farklılıklar gösterebilmektedir (Murashima vd., 2002; Singh vd., 2004; Saha, 2004).

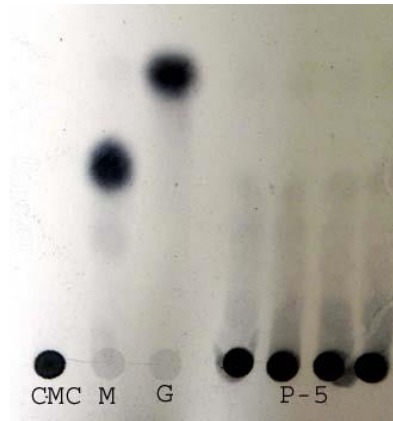
Enzimin hidrolitik performas değerlendirilmesinde en yüksek aktivite % 2.0'lik CMC konsantrasyonunda elde edilmiştir. Konsantrasyon % 4.0 olduğunda enzim aktivitesi substrat konsantrasyonunun artışına bağlı olarak düşmüştür (Şekil 7). %2'lik substrat konsantrasyonundaki en yüksek aktivite ise Jorgensen ve Olsson'un (2006) bulgularından daha yüksek bir değerdir.



Şekil 7: Endo β- 1-4 Glukanaz P-5 enzimini üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

3.3. Enzimatik Aktivite Sonucu Oluşan Ürünlerin Saptanması

Bacillus sp. P-5 endoglukanaz enziminin pH 7.5'de 55°C'de CMC'yi hidrolizi sonucu sellobiyoz ve diğer daha uzun zincirli selooligosakkaritler oluştuğu ince tabaka kromatografisi sayesinde belirlenmiştir. İnkübasyon süresi uzatıldıkça eser miktarda glukoz varlığı da daha belirgin görülebilmemesi muhtemeldir (Fotoğraf 2).



Fotoğraf 2: *Bacillus* sp. P-5 Endoglukanaz enzimine ait ince tabaka kromatografi bulguları (CMC: Enzim ilave edilmemiş CMC çözeltisi, M: Maltos; G: Glukoz; P-5 Endoglukanaz enzimi hidroliz ürünleri).

4. Sonuç

Dünyadaki enerji kaynağı yetersizliği ve çevresel kirlilik kaygılarından dolayı araştırmacıların çoğunun ilgi alanı doğadaki bol bulunan ve yenilenebilir kaynakların etkin

kullanımı enerjiden hayvan beslemeye kadar farklı alanlar için çalışma konusu olmuştur. Selülozun biyolojik dönüşümü için de *Bacillus* cinsi bakteriler güvenli ve ekstrasellüler enzim üreticileri olmaları açısından önemli bir endüstriyel aktör olmuştur. Bu çalışmada, selülaz enzimi üreten *Bacillus* sp. P-5 suşu izolasyonu gerçekleştirilmiş ve suşun ve enziminin fiziko kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Geniş bir optimum pH ya sahip olması, 50°C'ye kadar oldukça stabil olması, bir çok kimyasala ve deterjanlara dirençli olması P-5 endoglukanaz enzimini kağıt hamuru ve biyoetanol üretimi gibi bir çok endüstriyel uygulama için potansiyel bir aday yapmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma kısmen 111O296 no'lu Tubitak projesi ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M. S., Shirai, Y., Hassan, M. A. 2006. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *J. Eng. Technol.*, 3: 47–53.
- Aygan, A. Arikan, B. 2008. A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp.C14 isolated from Van soda lake. *Int. J. Agri. Biol.*, 10:369–374.
- Balasubramanian, N., Toubarro, D., Teixeira, M., Simões, N. 2012. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Thermo-stable Carboxymethyl Cellulase from Azorean Isolate *Bacillus mycoides* S122C. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 168:2191–2204.
- Bernhardsdotter, E.C.M.J., Ng, J.D., Garriot, O.K., Pusey, M.L. 2005. Enzymic properties of an alkaline chelator-resistant α -amylase from alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate L1711. *Process Biochem.*, 40:2401-2408.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, G., Omer, C., Ashabil, A., Osman.G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem.*, 38: 1397–403.
- Endo, K., Y. Hakamada, S. Takizawa and H. Kubota. 2001. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties and nucleotide and deduced amino acid sequences. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 109–116.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.*, 1-18.
- Jorgensen, H., Olsson, L. 2006. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888- Effect of Substrate on hydrolytic Performance. *Enzyme Microb. Technol.*, 38: 381-190.
- Juhasz, T., Szengyel, Z., Reczey, K., Sika-Aho, M., Viikari, L. 2005. Characterization of cellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochem.*, 40: 3519-3525.
- Kang, H.J., Uegaki, K., Fukada, H., Ishikawa, K. 2007. Improvement of the enzymatic activity of the hyperthermophilic cellulase from *Pyrococcus horikoshi*. *Extremophiles*, 11: 251-256.
- Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I., Kim, S.W. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Tech.*, 91: 153-156.

- Krishna, C. 1999. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana waste. *Bioresour. Technol.*, 69: 231–239.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Jo, L.I., Lee, N.K., Chung, C.H., Lee, Y.C., Lee, J.W. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresour. Technol.*, 99: 378-386.
- Madern, D., Ebel, C., Zaccari, G. 2000. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4: 91–98.
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya R., Mattiason, B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by *Bacillus* Strain. *J. Biotechnol.*, 83: 177–187.
- Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Kuga, J., Moriya, T., Simuda, N. 2002. Purification and characterization of new endo-1, 4- β -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme Microb. Biotechnol.*, 30: 319–326.
- Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., Tanticharoen, M. 1999. Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 694-697.
- Saha, B.C. 2004. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochem.*, 39: 1871-1876.
- Saul, D.J., Williams, L.C., Grayling, R.A., Chamley, L.W., Love D.R., Bergquist, P.L. 1990. *ceiB*, a Gene Coding for a Bifunctional Cellulase from the Extreme Thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*". *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3117–3124.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Can. J. Microbiol.*, 50:1-17.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C. 2001. A highly thermostable, alkaline CMCCase produced by a newly isolated *Bacillus* sp.VG1. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 761–5.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C. 2004. Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 51–56.
- Tolan, J.S., Foody, B. 1999. Cellulase from submerged fermentation. In: Tsao GT (ed.). *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*. Springer-Verlag, Berlin. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* pp. 41-67.
- Voget, S., Steele, H.L., Streit, W.R. 2006. Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. *J. Biotechnol.*, 126: 26–36.
- Wood, T.M. 1988. Preparation of crystalline, amorphous and dyed cellulase substrate. *Methods. Enzymol.*, 166: 19-45.
- Yin, L.J., Lin, H.H., Xiao, Z.R. 2010. Purification and Characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *J. Marine Sci. Technol.*, 18: 466- 471.