

Bacillus İzolatları Tarafından Üretilen Asit-dirençli Selüloz Enzimlerinin Kısmi Karakterizasyonu

Cansu Nur KARATURNA¹, Bahri Devrim ÖZCAN^{2*}, Elif DİKKAYA^{3*}

¹Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootehni Anabilim Dalı, 01330, Adana, Türkiye

^{2,3}Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, 01330, Adana, Türkiye

¹<https://orcid.org/0009-0005-2253-485X>

²<https://orcid.org/0000-0002-9198-656X>

³<https://orcid.org/0000-0002-1896-9608>

*Sorumlu yazar: bdozcan@gmail.com

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 03.06.2024

Kabul tarihi: 20.12.2025

Online Yayınlanma: 09.09.2026

Anahtar Kelimeler:

Bacillus sp.

İzolasyon

Asit-dirençli selüloz

Karakterizasyon

ÖZ

Bu çalışmada, topraktan selüloz aktivitesine sahip iki asidofil *Bacillus* izolatı elde edilmiş ve kısmen karakterize edilmiştir. İzolatlar sırasıyla *Bacillus* sp. CNK1 ve CNK2 olarak adlandırılmıştır. CNK1 selüloz, bakterinin üreme periyodunun 48. saatinde maksimum aktivite seviyesine ulaşırken; CNK2 selüloz bu seviyeye 72. saatte ulaşmıştır. Her iki selüloz enzimi de optimum aktiviteyi 40 °C’de göstermiştir; CNK1 için optimum pH 4,0 iken CNK2 için 5,0 olarak belirlenmiştir. CNK1 selüloz CaCl₂ varlığında stimüle edilirken MgCl₂, CoCl₂, EDTA ve SDS tarafından inhibe edilmiştir. Buna karşılık CNK2 selüloz CaCl₂, CoCl₂, MgCl₂ ve EDTA tarafından stimüle edilmiş; SDS tarafından ise inhibe edilmiştir. Zimogram analizi sonucunda CNK1 ve CNK2 selülozlarının moleküler kütleleri sırasıyla yaklaşık 21,1 kDa ve 231,9 kDa olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu asidostabil ve orta sıcaklıkta aktif enzimler, özellikle kağıt ve tekstil endüstrisinde liflerin işlenmesi, tarımda bitki atıkları ve lignoselülozik atıkların biyolojik olarak parçalanması, gıda endüstrisinde meyve-sebze işleme süreçleri ve biyoyakıt üretimi gibi geniş bir yelpazede endüstriyel uygulama potansiyeli taşımaktadır. Bu yönüyle çalışma, asidik koşullarda verimli çalışabilen selülozların biyoteknolojik üretimi ve endüstriyel kullanımına yönelik önemli bir katkı sunmaktadır.

Partial Characterisation of Acid-stable Cellulase Enzymes Produced by *Bacillus* Isolates

Research Article

Article History:

Received: 03.06.2024

Accepted: 20.12.2025

Published online: 09.09.2026

Keywords:

Bacillus sp.

Isolation

Acid-stable cellulase

Characterization

ABSTRACT

In this study, two acidophilic *Bacillus* isolates exhibiting cellulase activity were obtained from soil and partially characterised. The isolates were designated as *Bacillus* sp. CNK1 and CNK2, respectively. The cellulase produced by CNK1 reached its maximum activity level at 48 hours of bacterial growth, whereas the CNK2 cellulase peaked at 72 hours. Both cellulase enzymes exhibited optimum activity at 40 °C; the optimum pH was determined to be 4.0 for CNK1 and 5.0 for CNK2. While the CNK1 cellulase was stimulated by CaCl₂ and inhibited by MgCl₂, CoCl₂, EDTA, and SDS, the CNK2 cellulase was stimulated by CaCl₂, CoCl₂, MgCl₂, and EDTA but inhibited by SDS. Zymogram analysis revealed that the molecular weights of CNK1 and CNK2 cellulases were approximately 21.1 kDa and 231.9 kDa, respectively. These acid-stable and moderately thermophilic enzymes possess significant potential for industrial applications, including fibre processing in the paper and textile industries, biological degradation of plant residues and lignocellulosic wastes in agriculture, fruit and vegetable processing in the food industry, and biofuel production. In this context, the study contributes to the

To Cite: Karaturna CN., Özcan BD., Dikkaya E. *Bacillus* İzolatları Tarafından Üretilen Asit-dirençli Selüloz Enzimlerinin Kısmi Karakterizasyonu. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2026; 9(4): 2369-2383.

1. Giriş

Doğada bol miktarda bulunan ve suda çözünmeyen bir polisakkarit olan selüloz, bitki hücre duvarının ana yapısını oluşturur. Glikoz moleküllerinin β -1,4 glikozidik bağlarla birleşmesiyle oluşan selüloz, aynı zamanda tatsız ve kokusuzdur ve bitkiye güç ve dayanıklılık sağlar. Selüloz içeriği bitkiden bitkiye değişir. Örneğin odun %40-50, bambu %74, keten %60-81, pamuk %82-96, buğday samanı %65, soya samanı %84, mısır sapı %81 oranında selüloz içerir (Kozen ve Netravali, 2014). Selüloz, polimerik yapısı nedeniyle sadece kağıt ve karton endüstrisinde değil, diğer endüstrilerde de geniş bir kullanım alanına sahiptir (Kırcı, 2001). Bu özellikler, selülozun kimyasal olarak modifiye edilerek yeni ürünlerin yaratılması, selülozun avantajlarını daha da artırmak ve kullanım alanlarını genişletmek için bir fırsat sağlamaktadır. Selülozun bu tür modifikasyonları, yalnızca malzeme özelliklerini geliştirmekle kalmayıp aynı zamanda farklı endüstrilerde uygulanabilecek yeni türevlerin geliştirilmesine de zemin hazırlar. Bu bağlamda, selülozun en önemli türevlerinden biri olan karboksimetil selüloz (CMC) öne çıkmaktadır.

Karboksimetil selüloz (CMC), anhidroglukozun doğrusal bir polisakkariti olan selülozun anyonik bir türevidir (Rahman ve ark., 2021). CMC ve selüloz arasındaki temel fark, CMC yapısındaki bazı anyonik karboksimetil gruplarının ($-\text{CH}_2\text{COOH}$), selüloz yapısındaki bazı hidroksil gruplarından gelen hidrojen atomlarının yerini almasıdır (Rahman ve ark., 2021). CMC ve diğer selüloz türevlerinin üretiminde en kritik adımlardan biri, yüksek verimli ve spesifik enzimlerin kullanılmasıdır. Bu noktada, mikrobiyal kaynaklı enzimler ön plana çıkar.

Mikrobiyal kaynaklı enzimler, yüksek aktivite seviyelerine sahip olmaları, zararlı yan ürünler üretmemeleri, diğer enzimlere göre daha dayanıklı olmaları, büyük miktarlarda üretilibilmeleri ve üretimlerinin ekonomik olması nedeniyle hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimlere göre tercih edilmektedir (Wiseman, 1987). Biyokimyasal açıdan, bu enzimler yüksek katalitik etkinlikleri sayesinde substratlarını hızlı ve özgül bir şekilde parçalayıp hedef ürünleri yüksek verimle elde etme olanağı sunar (Cherry ve Fidantsef, 2003). Endüstriyel üretim açısından, mikrobiyal enzimler fermantasyon teknolojileri kullanılarak kısa sürede ve düşük maliyetle büyük ölçeklerde üretilbilir; bu durum hem maliyet etkinliğini hem de sürdürülebilir üretim kapasitesini artırır (Singhania ve ark., 2010). Fizikokimyasal özellikleri bakımından ise, pek çok mikrobiyal enzim ekstrem sıcaklık ve pH koşullarında bile kararlılığını korur; bu özellik, onların farklı endüstriyel proseslere uyum sağlamasında kritik bir avantaj sağlar (Bhat ve Bhat, 1997). Bu çok yönlü avantajlar, mikrobiyal enzimlerin endüstride gıda işleme, tekstil, biyoyakıt üretimi, atık yönetimi ve ilaç sanayii gibi geniş bir yelpazede kullanımını mümkün kılmaktadır. Bu enzimler çoğunlukla küfler, bakteriler ve mayalardan elde edilmektedir. Mikroorganizmalar arasında *Bacillus* türleri; kolay ve düşük maliyetle üretilibilmeleri, geniş sıcaklık

ve pH aralığında yaşayabilmeleri nedeniyle, endüstriyel enzimler ve probiyotik ürünlerin üretiminde yaygın olarak tercih edilmektedir (Bader ve ark., 2012). Ayrıca, farklı ekosistemlerden kolayca izole edilebilmeleri, kompleks ve sentetik ortamlarda üreyebilme yetenekleri de *Bacillus* türlerinin biyoteknolojide tercih edilmesinin diğer nedenleri arasındadır (Sinoquet ve ark., 1998). *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* (Fogarty ve Kelly, 1980), *B. stearothermophilus* (Wind ve ark., 1994), *B. subtilis* (Takasaki, 1983), *B. megaterium* (Brumm ve ark., 1991) ve *B. circulans* (Takasaki, 1985) endüstriyel enzim üretiminde kullanılan başlıca *Bacillus* türleridir.

Endoglukanazlar (β -1,4-D-glukan glukanohidrolaz; EC 3.2.1.4), ekzoglukanazlar (β -1,4-D-glukan selobiohidrolaz; EC 3.2.1. 91) ve β -1,4-D-glukozidazlar (cellobiase veya β -D-glukozid glikozil hidrolaz; EC 3.2.1.21), selobiyoza glukoz birimlerine ayırır (Ryu ve Mandels, 1980; Shimada ve ark., 1994). Genel olarak, *Bacillus*, diğer selülitik bakteriler gibi, selüloz ve diğer β -glukan substratlarına karşı düşük hidrolitik aktiviteye sahiptir. Mantarlar selüloz enzimlerinin önemli kaynakları olmasına rağmen, bakteriler yüksek üreme hızları nedeniyle mantarlardan daha fazla selüloz üretme potansiyeline sahiptir (Sethi ve ark., 2013). Selülozlar gıda ve içecek (Bhat, 2000), tekstil (Bhat ve Bhat, 1997), kağıt (Arja, 2007), deterjan (Shirai ve ark., 2001) endüstrilerinin yanı sıra yem katkı maddesi olarak hayvan beslenmesinde (Bhat ve Bhat, 1997), lignoselülozik atıklardan biyoyakıt üretiminde, selülozik materyalden etanol, fermente şekerler, tek hücre proteinleri üretiminde (Sukumaran ve ark., 2005) ve ayrıca endüstriyel ve tarımsal atıkların sakarifikasyonunda (Kıran ve ark., 2006) kullanılmaktadır.

Selüloz enzimleri, bitkisel biyokütledeki selülozun parçalanmasında kritik rol oynayan ve biyoyakıt, kâğıt endüstrisi, gıda teknolojisi gibi birçok alanda yaygın şekilde kullanılan hidrolaz sınıfı enzimlerdir (Lynd ve ark., 2002; Kuhad ve ark., 2011). Ancak, standart selülozlar genellikle nötr veya hafif asidik koşullarda optimum aktivite gösterir ve düşük pH koşullarında kararlılıkları sınırlıdır (Bhat ve Bhat, 1997). Buna karşın, karboksimetil selüloz (CMCaz) enzimleri, selülozun suda çözünür türeği olan karboksimetil selülozu hidrolize edebilme yetenekleri ve aside dirençli varyantlarının bulunabilmesi sayesinde, özellikle düşük pH ortamlarında sürdürülebilir aktivite sunar (Sukumaran ve ark., 2005). Bu özellik, gıda fermantasyonu, meyve suyu berraklaştırma ve asidik endüstriyel atıkların biyolojik arıtımı gibi süreçlerde büyük avantaj sağlamaktadır. Bu çalışmanın amacı, aside dirençli karboksimetil selüloz (CMCaz) enzimi üreten bakterileri topraktan izole etmek ve enzimlerin kısmi karakterizasyonunu yapmaktır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bakteriler ve büyüme ortamları

Bacillus sp. CNK1 ve CNK2 bakterilerinin izolasyonu toprak örneklerinden Madika ve ark. (2017)'de verilen protokolden modifiye edilmiş yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toprak örnekleri, Çukurova Üniversitesi kampüsünün farklı bölgelerinden, tarımsal ilaç veya kimyasal gübre uygulaması yapılmamış alanlardan, üstten yaklaşık 5–10 cm derinlikten steril koşullarda alınmıştır. 10 ml steril distile su 1 g toprak örneğine eklenmiş ve vorteksenerek karıştırılmıştır. On beş dakikalık bekleme

süresinin ardından, durulanmış numuneden 500 µl alınarak steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Gram-pozitif ve spor oluşturan *Bacillus* suşlarının seçilmesi amacıyla, bu tüpler 80 °C'de 10 dakika süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Asidofilik *Bacillus* sporları LB broth (tripton (10 g/l), maya özütü (5 g/l) ve NaCl (10 g/l) (pH 5.5)) kullanılarak 37 °C'de 24 saat boyunca çimlendirilmiştir. Bakteri kültürleri 10⁻⁶'ya kadar seyreltilmiş, ardından 10⁻⁵ ve 10⁻⁶ seyreltmelerden 100 µl alınarak LB-agar (15 g/L agar ile desteklenmiş LB broth) plakalarına yayılmıştır. Plakalar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş, gelişen koloniler steril kürdanlarla toplanarak karboksimetilselülaz (CMCaz) aktivitesinin tespiti amacıyla LB-CMC-agar (%0,1 CMC içeren LB-agar) üzerine aktarılmıştır. Bu plakalar da 37 °C'de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuş, ardından kolonilerin üzerine yeterli miktarda %0,1 (w/v) Congo-red çözeltisi eklenmiş ve 15 dakika bekletilmiştir. Boya uzaklaştırıldıktan sonra aynı miktarda 1 M NaCl çözeltisi ilave edilmiş, 15 dakika daha beklenmiş ve NaCl çözeltisi uzaklaştırılmıştır. İşlem sonunda plakalar ışıklı bir pano üzerinde incelenmiş, etrafında sarımtırak zon bulunan koloniler CMCaz üreten bakteriler olarak tanımlanmıştır (Ariffin ve ark., 2006).

2.2. Enzim analizleri

Bacillus sp. CNK1 ve CNK2, LB besiyerinde 37 °C'de, 80 rpm çalkalama hızında 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Üreme sürecinin tamamlanmasının ardından, bakteri hücreleri santrifüj (Hettich Universal EBA12) ile 700 rcf'de 10 dakika çalıştırılarak ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücresiz süpernatantlar, enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. CMCaz aktivitesinin tayini için, 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,5) içinde hazırlanmış 0,5 ml substrat çözeltisine (%2, w/v karboksimetil selüloz) eşit hacimde 0,5 ml enzim çözeltisi (bakteri süpernatantı) eklenmiş, karışımlar 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyonlar, 1,5 ml 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) reaktifi ilave edilerek sonlandırılmış ve oluşan renk değişimi spektrofotometrede (Pharmacia) 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Miller, 1959).

2.3. Sıcaklık ve pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Sıcaklık ve pH'nın enzim aktivitesi üzerindeki etkileri 40 ila 90 °C arasında değişen sıcaklık ve 4,0 ila 10,0 arasında değişen pH değerlerinde 30 dakika boyunca test edilmiştir. pH reaksiyonlarında 100 mM Na-asetat (pH 4,0-6,0), 100 mM Na-fosfat (pH 6,0-8,0) ve 100 mM Tris (pH 8,0-10,0) tamponları kullanılmıştır. (Gessesse ve Gashe, 1997; Burhan ve ark, 2003).

2.4. İnkübasyon aralığının enzim üretimi üzerine etkisi

Deneyler, bakterilerin inokülasyon anından itibaren 24., 48., 72. ve 96. saatlerde gerçekleştirilmiş; bu zaman noktalarında elde edilen enzim aktiviteleri materyal ve metot bölümünde belirtilen DNS yöntemine göre belirlenmiştir.

2.5. Kimyasal maddelerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çeşitli kimyasalların enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri, ekstraselüler enzimlerin substratlar eklenmeden önce optimum sıcaklık değerlerinde 30 dakika boyunca CaCl_2 , MgCl_2 , CoCl_2 , SDS ve EDTA (her biri 5 mM) varlığında ön inkübasyona tabi tutulmasıyla belirlenmiştir (Lo ve ark., 2001). Bağlı enzim aktiviteleri standart enzim deneyi koşulları altında ölçülmüştür. Herhangi bir katkı maddesi içermeyen kontrol grubu %100 aktivite olarak alınmış, muamele gruplarının enzim aktivite düzeyleri ise buna göre oransal olarak hesaplanmıştır.

2.6. İzolatların bazı antibiyotiklere karşı tepkilerinin belirlenmesi

Ticari antibiyotik diskleri (Oxoid, P: Penisilin (10 µg), CIP: Siprofloksasin (5 µg), AMP: Amfisilin (10 µg), CN: Gentamisin (10 µg), SH: Spektinomisin (10 µg), TE: Tetrasiklin (30 µg), S: Streptomisin (10 µg)) dirençlerini belirlemek için izolatlar uygulanmıştır. Bakteri suşlarının antibiyotiklere karşı direnci, antibiyotik disklerinin etrafındaki bakteri üremesi incelenerek belirlenmiştir.

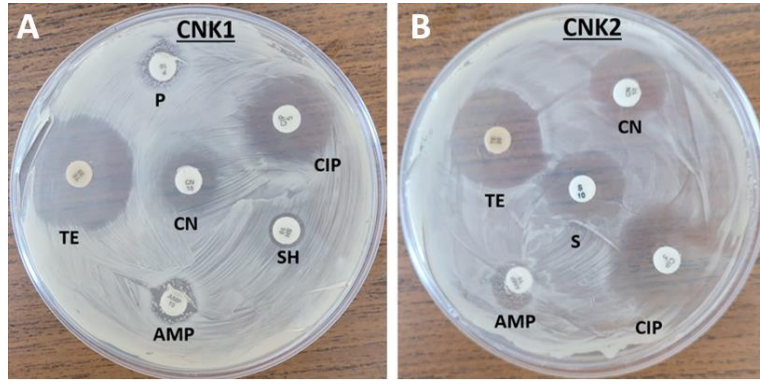
2.7. Hücre dışı proteinlerin elektroforezi ve zimogram analizi

Denatüre proteinleri çöktürmek için, 48 saatlik inkübasyonun ardından, üretilen izolatlar santrifüj (700 rcf, 10 dakika) ile ayrılmış ve elde edilen kültür süpernatantları eşit hacimde trikloroasetik asit (TCA, %20 w/v) ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında bir gecelik inkübasyonun ardından, örnekler hücre dışı proteinleri çöktürmek için 10 dakika boyunca 700 rcf'de santrifüj edilmiştir. 30 dk süreyle kurutulan protein peletleri 100 µl Tris-HCl tamponu (0,1 M, pH 8,0) ile çözülmüş ve ardından Laemmli (1970)'e göre %12'lik SDS-PAGE ve SDS-CMC-PAGE'de (%0,2 CMC) elektroforez edilmiştir. SDS-CMC-PAGE'de CMCaz aktivitesinden sorumlu bantlar Özcan ve ark. (1996)'da belirtildiği şekilde jelin Congo-red ve NaCl solüsyonları ile muamele edilmesi sonucu belirlenmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Gram-pozitif, aerobik ve spor oluşturan asidofilik *Bacillus* suşları CNK1 ve CNK2 izole edilmiştir. İzolatlar 37°C'de LB besiyerinde pH 5,5'te optimum gelişme göstermiştir. Her iki suş da substrat olarak CMC içeren LB-agar plaklarında CMCaz aktiviteleri göstermiştir.

Antibiyogram analizine göre, *Bacillus* sp. CNK1 zon çaplarına göre farklı oranlarda Tetrasiklin, Siprofloksasin, Gentamisin ve Amfisilin antibiyotiklerine duyarlı bulunurken, Penisilin ve Spektinomisin antibiyotiklerine ise dirençli bulunmuştur (Şekil 1A). *Bacillus* sp. CNK2, Tetrasiklin, Siprofloksasin, Gentamisin ve Streptomisin antibiyotiklerine zon çaplarına göre farklı oranlarda duyarlı bulunurken, Amfisilin antibiyotiğine ise dirençli bulunmuştur (Şekil 1B).



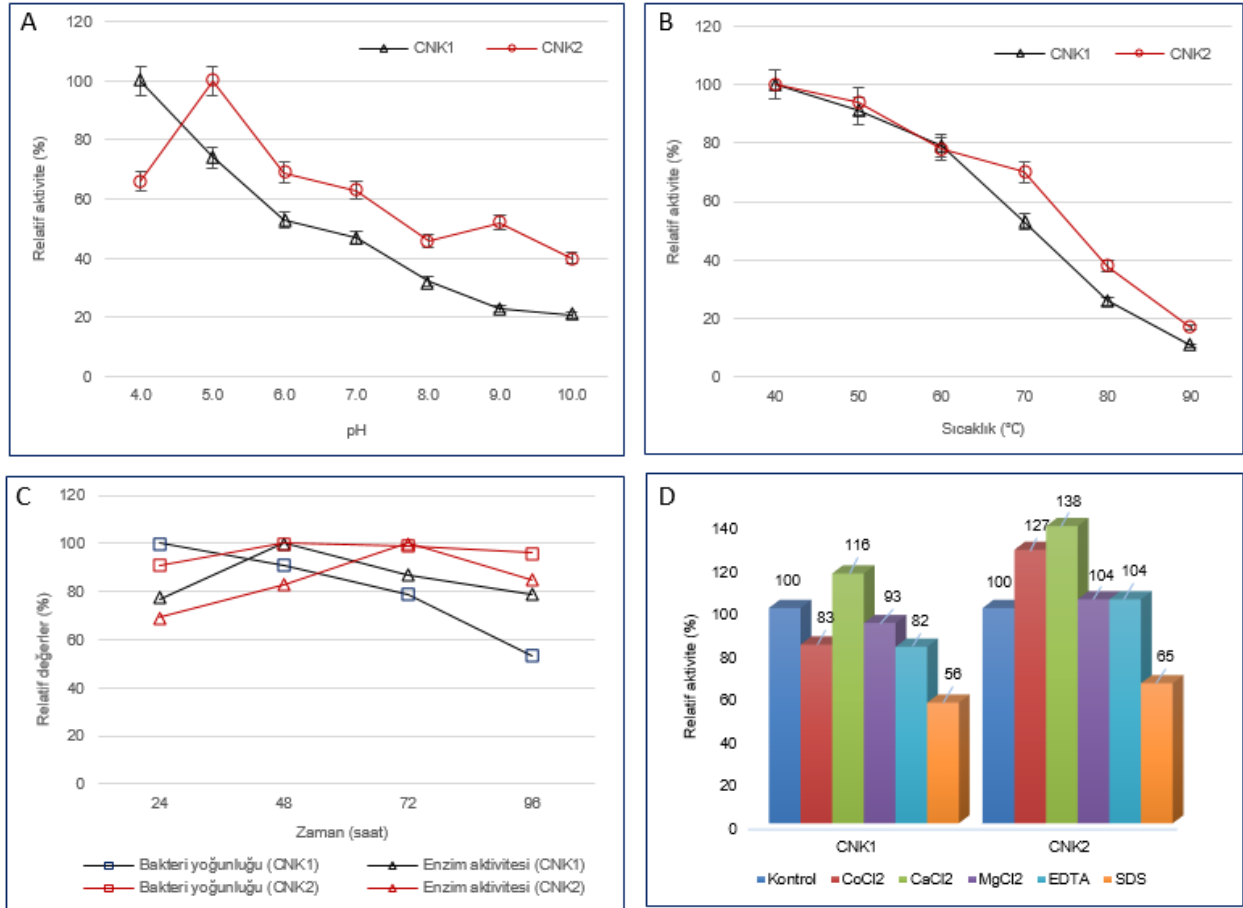
Şekil 1. *Bacillus* sp. CNK1 ve CNK2 bakterilerinin antibiyogram test sonuçları (P: Penisilin, CIP: Siprofloksasin, AMP: Amfisilin, CN: Gentamisin, SH: Spektinomisin, TE: Tetrasiklin, S: Streptomisin)

Bacillus sp. CNK1 ve CNK2 izolatu tarafından üretilen CMCaz enziminin optimum pH değerini sırasıyla 4,0 ve 5,0 olarak belirlenmiştir. *Bacillus* sp. CNK1 CMCaz'ı 5,0, 6,0 ve 7,0 pH değerleri arasında sırasıyla %74, %53 ve %47 oransal aktivite gösterirken, 8,0, 9,0 ve 10,0 pH değerlerinde sırasıyla %32, %23 ve %21 oransal aktivite göstermiştir. CNK1 CMCaz enziminin asidik olan 4,0-6,0 pH değerleri arasındaki ortalama oransal aktivitesi %76 olarak belirlenirken, bazik pH değerleri olan 8,0-10,0 arasındaki ortalama oransal aktivitesi %25 olarak belirlenmiştir. *Bacillus* sp. CNK2 CMCaz'ı 4,0, 6,0 ve 7,0 pH değerleri arasında sırasıyla %66, %69 ve %63 oransal aktivite gösterirken, 8,0, 9,0 ve 10,0 pH değerlerinde sırasıyla %46, %52 ve %40 oransal aktivite göstermiştir. Buna karşılık CNK2 CMCaz enziminin asidik olan 4,0-6,0 pH değerleri arasındaki ortalama oransal aktivitesi %78 olarak belirlenirken, bazik pH değerleri olan 8,0-10,0 arasındaki ortalama oransal aktivitesi %46 olarak belirlenmiştir (Şekil 2A).

Bacillus sp. CNK1 ve CNK2 izolatları tarafından üretilen CMCaz enzimlerinin her ikisinin de optimum çalıştığı sıcaklık değeri 40 °C olarak belirlenmiştir. *Bacillus* sp. CNK1 CMCaz'ı 50 °C, 60 °C ve 70 °C'lerde sırasıyla %91, %79 ve %53 oransal aktivite gösterirken, CNK2 CMCaz'ı aynı sıcaklık değerlerinde sırasıyla %94, %78 ve %70 oransal aktivite göstermiştir. 70 °C'den sonra her iki enzim de hızlı bir aktivite kaybına uğramıştır (Şekil 2B).

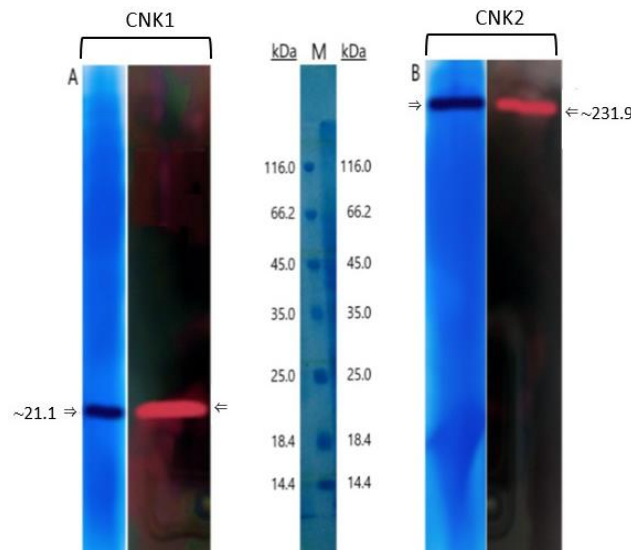
Bacillus sp. CNK1 bakterisi en yüksek hücre yoğunluğuna inokülasyondan itibaren 24. saatte ulaşırken, en yüksek enzim üretim seviyesine 48. saatte ulaşmıştır (Şekil 2C). *Bacillus* sp. CNK2 bakterisi ise en yüksek hücre yoğunluğuna inokülasyondan itibaren 48. saatte ulaşırken, en yüksek enzim üretim seviyesine 72. saatte ulaşmıştır (Şekil 2C).

CaCl₂ CNK1 CMCaz enzim aktivitesini kontrol grubuna göre %16 oranında stimüle ederken, MgCl₂, CoCl₂, EDTA ve SDS sırasıyla %7, %17, %18 ve %44 oranlarında inhibe etmiştir. Buna karşılık, CaCl₂, CoCl₂, MgCl₂ ve EDTA CNK2 CMCaz enzimini kontrol grubuna göre sırasıyla %38, %27, %6 ve %4 oranlarında stimüle ederken, SDS %35 oranında inhibe etmiştir (Şekil 2D).



Şekil 2. *Bacillus* sp. CNK1 ve CNK2 bakterilerince üretilen CMCaz enzimlerinin bazı aktivite grafikleri (A: pH optimumu, B: Sıcaklık optimumu, C: Zamana göre enzim aktiviteleri, D: Bazı kimyasal maddelerin enzim aktiviteleri üzerine etkileri)

Yapılan zimogram analizi *Bacillus* sp. CNK1 CMCaz enziminin moleküler ağırlığını 21,1 kDa olarak ortaya koyarken, CNK2 CMCaz enziminin moleküler ağırlığını 231,9 kDa olarak ortaya koymuştur (Şekil 3).



Şekil 3. *Bacillus* sp. CNK1 ve CNK2 izolatlarına ait CMCaz enzimlerinin zimogram analiz görüntüsü

Yapılan bu çalışmada, CMCaz aktivitesine sahip iki *Bacillus* türü, *Bacillus* sp. CNK1 ve *Bacillus* sp. CNK2, izole edilmiştir. CMCaz enzimleri, başta bazı bakteri cinsleri (ör. *Bacillus*, *Cellulomonas*) ve filamentöz mantarlar (*Aspergillus*, *Trichoderma*) olmak üzere, çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Bakteriler içinde *Bacillus* cinsine ait bakteriler tarafından üretilen CMCaz enzimleri sıklıkla rapor edilmişlerdir. *Bacillus* cinsine ait türlerin CMCaz üretim kapasitesi, literatürde farklı pH koşullarında geniş bir aralıkta rapor edilmiştir. Bu çalışmada *Bacillus* sp. CNK1 ve CNK2 izolatlarının optimum pH değerleri sırasıyla 4,0 ve 5,0 olarak belirlenmiştir. Vijayaraghavan ve Vincent (2012), *Bacillus subtilis* suşunda optimum aktivitenin pH 4,5'te gerçekleştiğini bildirmiş ve bu değer CNK1 suşu ile benzerlik göstermiştir. Lee ve ark. (1996) ise optimum pH'ı 6,0 olarak rapor etmiş, bu farklılığın kültür ortamı bileşimi ve tampon sisteminden kaynaklanabileceğini belirtmiştir. Kim ve ark. (2009), Balasubramanian ve ark. (2012) ile Sivakumar ve ark. (2016), *Bacillus* türlerinin genellikle hafif asidik ile nötr pH aralığında en yüksek CMCaz aktivitesini sergilediğini ve bu pH koşullarının enzim stabilitesini desteklediğini bildirmiştir. Shankar ve ark. (2021) ise optimum aktiviteyi pH 7,0 civarında tespit etmiş, bu durumu suş özellikleri ve yetiştirme koşullarına bağlamıştır. Elde edilen bu veriler, CNK1 ve CNK2 izolatlarının pH toleranslarının geniş olduğunu ve optimum aktivitelerini literatürde rapor edilen değerlerin alt sınırına yakın pH koşullarında sergilediklerini göstermektedir.

Enzim analizleri sonucunda *Bacillus* sp. CNK1 CMCaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 4,0 olarak belirlenirken, CNK2 CMCaz enziminin optimum pH değeri 5,0 olarak belirlenmiştir. *Bacillus* türleri tarafından üretilen enzimler optimum çalışma pH değerleri konusunda geniş bir aralığa sahip olup farklı karakterler ortaya koyabilirler. Bu enzim yelpazesi içinde yüksek alkali koşullarda optimum aktivite gösteren enzimler olabildiği gibi, yüksek asidik koşullarda aktivite gösteren enzimler de bulunmaktadır. Nitekim Caf ve ark. (2014) *Bacillus* sp. TG-1 izolatı tarafından üretilen selüloz enziminin optimum pH değerinin 4,6 olduğunu ve enzimin 4,0-9,0 pH değerleri arasında stabil kaldığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Kocamaz ve Kocamaz (2019) *Bacillus* sp. S-41 selüloz enziminin optimum pH değerini 4,0, stabilite aralığını ise 3,0-9,0, Lee ve ark. (1996) *Bacillus* sp. KD1014 CMCaz enziminin optimum pH değerini 4,5, stabilite aralığını 4,0-6,0, Rawat ve Tewari (2012) *B. subtilis* LFS3 suşuna ait CMCaz enziminin optimum pH değerini 4,0, stabilite aralığını 3,0-6,0 olarak bildirmişlerdir. CNK1 ve CNK2 izolatları tarafından üretilen CMCaz enzimlerinin pH özellikleri bu enzimler ile büyük benzerlikler göstermektedir. Asidik karaktere sahip selüloz enzimleri özellikle hayvan beslemede yem katkı maddesi olarak, midenin asidik koşullarına dayanabileceklerinden dolayı yemlerin sindirilebilirliğini ve böylece yemden yararlanmayı artırmak adına kullanım potansiyeli taşımaktadırlar. *Bacillus* sp. CNK1 ve CNK2 CMCaz enzimleri optimum aktivitelerini 40 °C'de göstermişlerdir. Her iki izolatın da izolasyonu 37 °C inkübasyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. Mezofilik bakterilerce üretilen enzimlerin, optimum aktivitelerini bakterinin optimum üreme sıcaklığında göstermeleri beklenen bir durumdur. Vijayaraghavan ve Vincent (2012) izolasyonunu gerçekleştirdikleri *Bacillus* sp. selüloz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini 37 °C olarak bildirmişlerdir. Benzer

şekilde Shankar ve Isaiarasu (2011) *B. pumilus* EWBCM1 izolatına ait selülaaz enziminin de 37 °C'de optimum aktivitesini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bacillus sp. CNK1 izolatı en yüksek bakteri kütle artışına inokülasyondan itibaren 24. saatte ulaşırken, en yüksek CMCaz aktivitesini üreme periyodunun 48. saatinde göstermiştir. *Bacillus* sp. CNK2 izolatı ise en yüksek bakteri kütle artışına üreme periyodunun 48. saatinde ulaşırken, en yüksek CMCaz aktivitesini yine üreme periyodunun 72. saatinde göstermiştir. Bu özellik bakımından her iki izolat da farklı bir karakter ortaya koymuştur. Goyal ve ark. (2014) *Bacillus* sp. 312SI izolatının üreme periyodunun 48. saatinde maksimum CMCaz aktivitesi gösterdiğini bildirirken, Ladeira ve ark. (2015) *Bacillus* sp. SMIA-2 izolatının üreme periyodunun 168. saatinde maksimum CMCaz aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışma sonuçları, incelenen *Bacillus* izolatlarının maksimum CMCaz aktivitesine ulaşma süreleri açısından belirgin farklılıklar sergileyebileceğini ortaya koymaktadır. Bu farklılıklar, her bir izolatın büyüme kinetikleri, metabolik kapasitesi ve enzim sentez regülasyon mekanizmalarından kaynaklanabilir. Endüstriyel uygulamalarda işlemlerin ekonomik olması büyük önem taşımaktadır. Maksimum enzim aktivitesine üreme periyodunun erken safhalarında ulaşan bakteriler, daha az enerji ve zaman harcayacakları için ekonomik oldukları düşünülebilir. Uzun süren üreme periyotları ayrıca ortamda istenmeyen metabolitlerin ve/veya enzimlerin birikmesine sebep olabileceği için de ayrıca arzu edilmez. Yine uzun süren üreme periyotları boyunca ortamda biriken proteaz enzimlerinin hedef enzimi hidrolize etmelerine bağlı olarak verimlilikte azalmalara sebep olabilir. Diğer taraftan yine uzun süren üreme periyotlarında hedef enzimlerin yarı ömürlerine bağlı olarak inaktivasyon kayıpları yaşanabilir. Bu açıdan bakıldığında CNK1 izolatı endüstriyel kullanım için CNK2 izolatına göre daha ön plana çıkmaktadır.

5 mM CaCl₂ kullanımı *Bacillus* sp. CNK1 CMCaz enzimini %16 düzeyinde stimüle ederken, CNK2 CMCaz enzimini %38 düzeyinde stimüle etmiştir. CoCl₂, MgCl₂ ve EDTA CNK1 enzimini inhibe ederken, CNK2 enzimini stimüle etmiştir. SDS ise çalışılan kimyasal maddeler içinde her iki enzimi de inhibe eden tek kimyasal madde olarak belirlenmiştir. Kimyasal maddelerin farklı konsantrasyonlarda kullanımı enzim aktiviteleri üzerinde stimülasyon veya inhibisyon etkisi göstermelerini değiştirebilir. Örneğin Duman ve ark. (2016) *Bacillus methylotrophicus* Y37 CMCaz enzimi üzerinde ayrı ayrı olacak şekilde 1 mM CaCl₂ ve TPCK (Tosil fenilalanil klorometil keton) inhibitör etki gösterirken, 10 ve 100 mM kullanımlarının stimülatör etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kobaltın (Co) enzim aktivitesi üzerine etkileri değişkenlik gösterebilir. Trivedi ve ark. (2011) *Bacillus flexus* selülaazı üzerine inhibisyon etkisi olduğunu bildirirken, Shahid ve ark. (2016) *B. megaterium* selülaazı, Singh ve ark. (2004) ise *B. sphaericus* JS1 selülaazı üzerinde aktivatör etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise CoCl₂ CNK1 CMCazı üzerinde inhibitör, CNK2 CMCazı üzerinde ise aktivatör etki göstermiştir.

Şelat madde olan EDTA enzimler üzerinde oldukça farklı etkiler ortaya koyabilen bir diğer kimyasal maddedir. Zira Asha ve Sakthivel (2014) *B. subtilis* selülaaz enziminin kontrol grubunda 668 U/ml olan enzim aktivite düzeyinin 10 mM EDTA varlığında 3,33 U/ml seviyesine düştüğünü ve EDTA'nın

oldukça yüksek bir inhibisyon etkisi ortaya koyduğunu bildirmişlerdir. Yine Azadian ve ark. (2016) *B. licheniformis* AMF-07 selülazinin 5 mM EDTA varlığında %95 oranında inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Bunlara karşılık Kim ve ark. (2009) 5 mM EDTA'nın *B. subtilis* subsp. *subtilis* A-53 CMCaz enzimini %87 oranında aktive ettiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise EDTA (5 mM) CNK1 CMCaz enzimini %18 oranında inhibe ederken, CNK2 CMCaz enzimini %4 oranında aktive etmiştir ve yukarıda verilen literatür bildirişlerine göre kontrol grubuna daha yakın relatif aktiviteler göstermiştir. SDS'in *B. thuringiensis* bakterisinin BtI ve BtH suşlarında CMCaz enzimini sırasıyla %42,7 ve %38,6 oranlarında inhibe ettiği bildirilmiştir (Lin ve ark., 2012). CNK1 ve CNK2 CMCaz enzimlerinde SDS kaynaklı inhibisyon oranları ise sırasıyla %44 ve %35 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar oldukça benzer görünmektedir. SDS'in enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin, amino asitlerin hidrofobik grupları ile interaksyona girmesinin bir sonucu olabileceği bildirilmiştir (Lucas ve ark., 2001). Magnezyum iyonunun CNK1 ve CNK2 CMCaz enzimleri üzerine olan etkisi diğer birçok çalışma ile benzerlik göstermiştir. MgCl₂ CNK1 CMCaz enzimini %7 oranında inhibe ederken, CNK2 CMCaz enzimini %4 oranında aktive etmiştir. Duman ve ark. (2016) *Bacillus methylotrophicus* Y37 CMCaz enziminin 1 ve 10 mM MgCl₂ varlığında %9.6 oranında aktive artışı gösterdiğini bildirmişlerdir. Sankaralingam ve ark. (2018) ise *B. megaterium* selülazinin Mg varlığında %42 oranında inhibisyona uğradığını bildirmişlerdir.

Bacillus sp. CNK1 ve CNK2 bakterilerine ait CMCaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları sırasıyla 21,1 ve 231,9 kDa olarak hesaplanmıştır. Literatür taramaları *Bacillus*'lar tarafından üretilen selüla enzimlerinin genel olarak 40-65 kDa arasında olduğunu ortaya koymaktadır. Fakat bu sınırların oldukça dışına çıkan moleküler ağırlıklara sahip selüla enzimleri de rapor edilmiştir. Marco ve ark. (2017) *B. licheniformis* izolatu tarafından üretilen selüla enziminin moleküler ağırlığını 20 kDa, Listyaningrum ve ark. (2018) ise *B. licheniformis* C55 suşu tarafından üretilen selüla enziminin moleküler ağırlığını 18 kDa olarak bildirmişlerdir. Buna karşılık, Rawat ve Tewari (2012) *B. subtilis* LFS3 CMCaz enziminin moleküler ağırlığını 185 kDa, Singh ve ark. (2004) ise *B. sphaericus* JS1 selülazinin moleküler ağırlığını 183 kDa olarak bildirmişlerdir. Daha sıra dışı bir sonuç olarak, Kim ve Kim (1993) *B. circulans* F-2 suşuna ait iki adet selüla-ksilanaz enzim komplekslerinin (C-I ve C-II) moleküler ağırlıklarını sırasıyla 669 ve 443 kDa olarak bildirmişlerdir. Buradan, yüksek moleküler ağırlığa sahip enzimlerin birden fazla alt üniteden meydana gelmiş olabileceği kanısı oluşmaktadır. Zira Singh ve ark. (2004) *B. sphaericus* JS1 selülazinin 183 kDa moleküler ağırlığa sahip selüla enziminin muhtemelen dört alt üniteden meydana gelmiş olabileceğini ifade etmişlerdir. Bu bilgiler *Bacillus* sp. CNK2 CMCaz enziminin birden fazla alt üniteye sahip olma olasılığını ortaya çıkarmaktadır.

Sonuç

Bu çalışma kapsamında, Çukurova Üniversitesi kampüs alanından alınan toprak örneklerinden karboksimetil selüla (CMCaz) enzim aktivitesine sahip iki *Bacillus* suşunun izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatlar, *Bacillus* sp. **CNK1** ve *Bacillus* sp. CNK2 olarak tanımlanmıştır. Enzim

analizleri, her iki izolatın CMCaz enzimlerinin optimum aktivite sıcaklığının 40 °C olduğunu ortaya koymuştur. pH analizleri sonucunda, CNK1 izolatına ait enzimin optimum pH değerinin 4,0; CNK2 izolatına ait enzimin ise 5,0 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, her iki enzimin de mide gibi asidik ortamlarda aktivitesini sürdürebileceğini göstermektedir.

Bu özellik, özellikle geniş getiren hayvanlar (*ruminantlar*) ve tek mideli hayvanlar için formüle edilen yem katkı ürünlerinde potansiyel kullanım imkânı sunmaktadır. Endüstriyel ölçekte uygulamaların geliştirilmesi amacıyla, her iki izolatın CMCaz üretiminden sorumlu genlerinin klonlanması ve/veya hedefe yönelik yönlendirilmiş evrim ya da mutagenез gibi moleküler tekniklerle iyileştirilmesi önerilmektedir. Böylelikle enzimlerin spesifik aktivitesi (kalite) ve üretim verimi (kantite) gibi özellikleri optimize edilerek endüstriyel süreçlere daha uygun hale getirilebilir.

Ayrıca, enzim stabilitesi, substrat özgülüğü ve farklı üretim koşullarında verimliliğin değerlendirilmesine yönelik ek çalışmalar, bu enzimlerin yem katkı maddesi olarak kullanım potansiyelini daha iyi ortaya koyacaktır. Ölçek büyütme çalışmalarında üretim maliyetlerinin azaltılması, proses verimliliğinin artırılması ve ürünün ticari rekabet gücünün yükseltilmesi açısından önem taşımaktadır.

Teşekkür

Yazarlar bu çalışmayı FYL-2020-12839 nolu proje ile destekleyen Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye benzer oranlarda katkı sağlamış olduğunu beyan eder.

Kaynakça

- Amanda W., Thompson VF., Goll DE. Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biological Chemistry*, 2004; 385: 465-472.
- Ariffin H., Abdullah N., Umi Kalsom MS., Shirai Y., Hassan MA. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering and Technology* 2006; 3(1): 47-53.
- Arja MO. Cellulases in the textile industry. In *Industrial Enzymes: Structure, function and applications*, 2007; pp. 51-63. Dordrecht: Springer, Netherlands.
- Asha BM., Sakthivel N. Production, purification and characterization of a new cellulase from *Bacillus subtilis* that exhibit halophilic, alkalophilic and solvent-tolerant properties. *Annals of Microbiology*, 2014; 64(1): 1839-1848.

- Avanus K. Genetic variability of CAST gene in native sheep breeds of Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2015; 21(6): 789-794.
- Averna M., Tullio RD., Passalacqua M., Salamini F., Ponteremoli S., Mellon E. Changes in intracellular calpstatin localisation are mediated by reversible phosphorylation. *Biochemical Journal* 2001; 354: 25-30.
- Azadian F., Badoei-Dalfard A., Namaki-Shoushtari A., Hassanshahian M. Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus licheniformis* AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production. *Molecular Biology Research Communications*, 2016; 5(3): 143.
- Bader J., Albin A., Stahl U. Spore-forming bacteria and their utilisation as probiotics. *Beneficial Microbes*, 2012; 3(1): 67-75.
- Balasubramanian N., Toubarro D., Teixeira M., Simões N. Purification and biochemical characterization of a novel thermo-stable carboxymethyl cellulase from Azorean isolate *Bacillus mycoides* S122C. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2012; 168: 2191-2204.
- Bhat M. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 2000; 18(5): 355-383.
- Bhat MK., Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances* 1997; 15(3-4): 583-620.
- Brumm PJ., Hebeda RE., Teague WM. Purification and characterization of the commercialized, cloned *Bacillus megaterium* α -amylase. Part I: Purification and Hydrolytic Properties. *Starch-Stärke*, 1991; 43(8): 315-319.
- Burhan A., Nisa U., Gökhan C., Ömer C., Ashabil A., Osman G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry* 2003; 38(10): 1397-1403.
- Caf Y. Valipour E., Arikan B. Study on cold-active and acidophilic cellulase (CMCase) from a novel psychrotrophic isolate *Bacillus* sp. K-11. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2014; 3(5): 16-25.
- Cherry JR., Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: An update. *Current Opinion in Biotechnology* 2003; 14(4): 438–443.
- Duman Y., Karakuş YY., Sertel A., Polat F. Production, purification, and characterization of a thermo-alkali stable and metal-tolerant carboxymethylcellulase from newly isolated *Bacillus methylotrophicus* Y37. *Turkish Journal of Chemistry* 2016; 40(5): 802-815.
- Gessesse A., Gashe BA. Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake. *Biotechnology Letters* 1997; 19: 479-481.
- Goyal V., Mittal A., Bhuwal AK., Singh G., Yadav A., Aggarwal NK. Parametric optimization of cultural conditions for carboxymethyl cellulase production using pretreated rice straw by *Bacillus*

- sp. 313SI under stationary and shaking conditions. *Biotechnology Research International*, 2014; Article ID 651839, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2014/651839>.
- Kelly CT., Heffernan ME., Fogarty WM. A novel α -glucosidase produced by *Bacillus amylolyticus*. *Biotechnology Letters* 1980; 2: 351-356.
- Kırcı H. Selüloz türevleri ve kullanım yerleri. *KSÜ Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* 2001; 4: 119-130.
- Kim BK., Lee BH., Lee YJ., Jin IH., Chung CH., Lee JW. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology* 2009; 44(6-7): 411-416.
- Kim CH., Kim DS. Extracellular cellulolytic enzymes of *Bacillus circulans* are present as two multiprotein complexes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1993; 42: 83-94.
- Kiran ÖE., Çömlekçioğlu U., Dostbil N. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *Fen ve Mühendislik Dergisi* 2006; 9: 12-19.
- Kocamaz S., Kocamaz D. Isolation and characterisation of acidic cellulase enzyme from native *Bacillus* sp. S-41 strain. *Journal of Applied Biological Sciences* 2019; 13(1): 01-05.
- Kozen FH., Netravali AN. Cellulosic fibers: A brief review. *Sustainable Composites* 2014; 143-180.
- Kuhad RC., Gupta R., Singh A. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research* 2011; 2011, 280696.
- Ladeira SA., Cruz E., Delatorre AB., Barbosa JB., Leal Martins ML. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp: SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology* 2015; 18(2): 110-115.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-685.
- Lee KD., Kim J. Kim H. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. KD1014 producing carboxymethyl-cellulase. *Journal of Microbiology* 1996; 34(4): 305-310.
- Lin L., Kan X., Yan H., Wang D. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electronic Journal of Biotechnology* 2012; 15(3): 1-7.
- Listyaningrum NP., Sutrisno A., Wardani AK. Characterization of thermostable cellulase produced by *Bacillus strains* isolated from solid waste of carrageenan. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, International Conference on Biomass and Bioenergy, Yogyakarta, Indonesia*, 2018.
- Lo HF., Lin LL., Chen HL., Hsu HH., Chang CT. Enzyme properties of a SDS-resistant *Bacillus* sp. TS-23 α -amylase produced by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 2001; 36: 743-750.
- Lucas R., Robles A., García MT., Alvarez de Cienfuegos G., Gálvez A. Production, purification, and properties of an endoglucanase produced by the hyphomycete *Chalara* (Syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49(1): 79-85.

- Lynd LR., Weimer PJ., van Zyl WH., Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002; 66(3): 506–577.
- Madika A., Ameh JB., Machido DA. Isolation and screening of *Bacillus subtilis* from soil for amylase production. *UMYU Journal of Microbiology Research (UJMR)* 2017; 2(2): 82-86.
- Marco ÉGD., Heck K., Martos ET., Van Der Sand ST. Purification and characterization of a thermostable alkaline cellulase produced by *Bacillus licheniformis* 380 isolated from compost. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2017; 89(3 Suppl.): 2359-2370.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959; 31(3): 426-428.
- Miyagi T., Kaneichi K., Fukumura M., Karita S., Sakka K., Shimada K., Ohmiya K. Electro-transformation of *Bacillus subtilis* for expressing a *Ruminococcus albus* cellulase gene. *Animal Science and Technology* 1994; 65(5): 407-407.
- Özcan N., Cunningham C., Harris WJ. Cloning of a cellulase gene from the rumen anaerobe *Fibrobacter succinogenes* SD35 and partial characterization of the gene product. *Letters in Applied Microbiology* 1996; 22(1): 85-89.
- Rahman MS., Hasan MS., Nitai AS., Nam S., Karmakar AK., Ahsan MS., Shiddiky MJA, Ahmed MB. Recent developments of carboxymethyl cellulose. *Polymers* 2021; 13(8): 1345.
- Rawat R., Tewari L. Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. *Extremophiles* 2012; 16: 637-644.
- Ryu DD., Mandels M. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology* 1980; 2(2): 91-102.
- Sankaralingam S., Palpperumal S., Harinathan B., Kathiresan D., Shankar T., Sundarapandian S. Screening and characterization of cellulase by *Bacillus megaterium* isolated from marine sediments and its antimicrobial activity. *Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* 2018; 17(5): 646-653.
- Sethi A., Kovaleva ES., Slack JM., Brown S., Buchman GW. Scharf ME. A GHF7 cellulase from the protist symbiont community of *Reticulitermes flavipes* enables more efficient lignocellulose processing by host enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 2013; 84(4): 175-193.
- Shahid ZH., Irfan M., Nadeem M., Syed Q., Qazi JI. Production, purification, and characterization of carboxymethyl cellulase from novel strain *Bacillus megaterium*. *Environmental Progress & Sustainable Energy* 2016; 35(6): 1741-1749.
- Shankar T., Isaiarasu L. Cellulase production by *Bacillus pumilus* EWBCM1 under varying cultural conditions. *Middle-East Journal of Scientific Research* 2011; 8(1): 40-45.
- Shankar T., Sankaralingam S., Balachandran C., Chinnathambi A., Nasif O., Alharbi SA., Sungwon P., Baskar K. Purification and characterization of carboxymethylcellulase from *Bacillus pumilus*

- EWBCM1 isolated from earthworm gut (*Eudrilus eugeniae*). Journal of King Saud University-Science 2021; 33(1): 101261.
- Shirai T., Ishida H., Noda JI., Yamane T., Ozaki K., Hakamada Y. Ito S. Crystal structure of alkaline cellulase K: Insight into the alkaline adaptation of an industrial enzyme. Journal of Molecular Biology 2001; 310(5): 1079-1087.
- Singh J., Batra N., Sobti RC. Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2004; 31(2): 51-56.
- Singhania, RR., Sukumaran RK., Patel AK., Larroche C., Pandey A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme and Microbial Technology 2010; 46(7): 541-549.
- Sinoquet H., Thanisawanyangkura S., Mabrouk H., Kasemsap P. Characterization of the light environment in canopies using 3D digitising and image processing. Annals of Botany 1998; 82(2): 203-212.
- Sivakumar N., Al Zadjali A., Al Bahry S., Elshafie A., Eltayeb EA. Isolation and characterization of cellulolytic *Bacillus licheniformis* from compost. African Journal of Biotechnology 2016; 15(43): 2434-2446.
- Sukumaran RK., Singhania RR., Pandey A. Microbial cellulases-production, applications and challenges. Journal of Scientific & Industrial Research 2005; 64: 832-844.
- Sukumaran RK., Singhania RR., Mathew GM., Pandey A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production. Renewable Energy 2005; 34(2): 421-424.
- Takasaki Y. An amylase producing maltotetraose and maltopentaose from *Bacillus circulans*. Agricultural and Biological Chemistry 1983; 47(10): 2193-2199.
- Takasaki Y. An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*. Agricultural and Biological Chemistry 1985; 49(4): 1091-1097.
- Trivedi N., Gupta V., Kumar M., Kumari P., Reddy CRK., Jha B. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. Carbohydrate Polymers 2011; 83(2): 891-897.
- Vijayaraghavan P., Vincent SGP. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Bacillus* sp. isolated from a paddy field. Polish Journal of Microbiology 2012; 61(1): 51-57.
- Wind RD., Buitelaar RM., Eggink G., Huizing HJ., Dijkhuizen L. Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: A highly thermostable α -amylase-producing strain. Applied Microbiology and Biotechnology 1994; 41: 155-162.
- Wiseman A. The application of enzymes in industry. In: Horwood, E. (Ed.), Handbook of Enzymes Biotechnology, Chichester-UK, 1987; 274-373.
- Wiseman A. Handbook of enzyme biotechnology. Ellis Horwood Limited. 1987.