

Termostabil ve Asidik Selülozün Karakterizasyonu ve Meyve Suyu Berraklaştırılmasında Kullanımı

Nihan Arabacı 

Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 01250, Adana, Türkiye

Öne Çıkanlar

- Selülozlar (E.C. 3.2.1.4), selülozun 1,4 β-D glikozit bağlarını hidroliz edip β-glikoz birimlerini açığa çıkarır.
- Meyve suyu üretiminde kullanılan selülozlar, meyve suyunu berraklaştırarak ürün verimini arttırmaktadırlar.
- Bacillus sp. S35'ten elde edilen ekstraselüler selülozün karakterizasyonu yapılmıştır.
- S35 selüloz asidik ve termostabil bir enzimdir.
- Enzimin optimum koşulları altında elma, şeftali ve üzüm sularını berraklaştırma kabiliyeti belirlenmiştir.

Makale Bilgileri

Geliş: 08/10/2025
Kabul: 04/11/2025

Anahtar Kelimeler

Selüloz,
Bacillus sp.,
Meyve Suyu
Berraklaştırma,
Transmittans

Öz

Bu çalışmada, elma, üzüm ve şeftali sularının berraklaştırılmasında mikrobiyal selüloz enziminin kullanılma potansiyeli araştırılmıştır. Bu amaçla, Bacillus sp. S35 suşundan selüloz enzimi izole edilmiştir. Enzimin endüstriyel potansiyelini belirlemek amacıyla karakterizasyonu yapılmıştır. S35 selüloz, pH 5,0'te ve 40°C'de optimum aktivite göstermiştir. Enzim, pH 4,0-10,0 ve 25-60°C aralıklarında oldukça stabil olup asit-alkali ve termostabil karakter sergilemiştir. Ca^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarına maruz kaldığında aktivitesini, sırasıyla, %89, %82, %88 ve %89 oranlarında koruyan selülozün aktivitesi, Co^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının varlığında %134 ve %130'a yükselmiştir. S35 selüloz, %0,02 β-merkaptotanol ve 1 mM iyodoasetamid inhibitörlerinin varlığında aktivitesinin tamamını korumuştur. 1 mM EDTA varlığında %28 oranında aktivite kaybetmiştir. Enzim, %10'luk aseton, asetonitril, n-bütanol, etanol, gliserol, izopropanol ve metanol varlığında, sırasıyla, %89, %77, %70, %84, %64, %80 ve %77 oranlarında stabil kalmıştır. Meyve suyu berraklaştırılması analizinde yapılan geçirgenlik ölçümüne göre, enzim en iyi berraklık oranını (%C) şeftali suyuundaki aktivitesi (%1421) sonucunda göstermiştir. İndirgen şeker miktarı analizinde de en yüksek verim 3 saatlik inkübasyon sonucunda şeftali suyuunda elde edilmiştir. Elde edilen bulgular, S35 selüloz enziminin, meyve sularının berraklaştırılmasında amacıyla içecek endüstrisi proseslerinde yer alabilecek potansiyel bir aday olduğunu göstermektedir.

Characterization of Thermostable and Acidic Cellulase and Its Use in Clarification of Fruit Juice

Highlights

- Cellulases (E.C. 3.2.1.4) hydrolyze the 1,4 β-D glycoside bonds of cellulose, releasing β-glucose units.
- Cellulases used in fruit juice production increase product yield by clarifying the juice.
- Extracellular cellulase obtained from Bacillus sp. S35 has been characterized.
- S35 cellulase is an acidic and thermostable enzyme.
- The enzyme's ability to clarify apple, peach, and grape juices under optimal conditions has been determined.

Article Info

Received: 08/10/2025
Accepted: 04/11/2025

Keywords

Cellulase,
Bacillus sp.,
Fruit Juice Clarification,
Transmittance

Abstract

This study examined the potential use of microbial cellulase in clarifying apple, grape, and peach juices. The enzyme was isolated from Bacillus sp. S35 strain and characterized to assess its industrial potential. S35 cellulase showed optimal activity at pH 5.0 and 40°C. It was highly stable across pH ranges of 4.0-10.0 and temperatures of 25-60°C, demonstrating acid-alkaline and thermostable properties. The enzyme retained 89%, 82%, 88%, and 89% activity when exposed to Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , and Zn^{2+} ions, respectively, and its activity increased to 134% and 130% with Co^{2+} , and Mn^{2+} ions. S35 cellulase remained fully active in the presence of 0.02% β-mercaptoethanol and 1 mM iodoacetamide inhibitors. It lost 28% activity with 1 mM EDTA. The enzyme was stable at 89%, 77%, 70%, 84%, 64%, 80%, and 77% in the presence of 10% acetone, acetonitrile, n-butanol, ethanol, glycerol, isopropanol, and methanol, respectively. Clarity tests (C%) in fruit juice clarification revealed the enzyme achieved 1421% activity in peach juice. The highest reducing sugar efficiency was observed after a 3-hour incubation in peach juice. These results suggest that S35 cellulase has potential for use in beverage industry processes for fruit juice clarification.

1. GİRİŞ

Selülozlar, 30 yıldan fazladır yaygın olarak kullanılan ve geniş uygulama yelpazesine sahip endüstriyel enzimlerdendir. β -1,4-glikozidik bağları hidrolize ederek selülozu parçalayan ve fermente edilebilir şekerlere dönüştüren biyokatalizörlerdir. Selülitik enzimler, endoglukanazlar (EC 3.2.1.4) (1,4- β -d-glukan-4-glukanohidrolaz veya karboksimetil selülaz), ekzoglukanazlar [Sellobiyohidrolaz (EC 3.2.1.91) ve selodekstrinaz (EC 3.2.1.74)] ve β -glukozidazlar (EC 3.2.1.21) olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılmaktadırlar [1, 2].

Bakteri ve mantarlar dâhil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedirler [2]. Selülozların çoğu yüksek aktivite göstermeleri ve bol miktarda enzim üretme kapasitesi olan mantarlardan elde edilmektedir. Son yıllarda, yüksek selüloz içerikli tarımsal hammaddelerin özellikle biyoyakıt üretiminde tercih edilmesiyle bakteriyel kökenli selülozlara yönelim artmıştır. Bakteriyel selülozlar, çoklu enzimatik kompleksler oluşturabilme, özgüllük, yüksek seçicilik, aşırı pH, sıcaklık ve tuzluluk gibi zorlu koşullarda daha yüksek aktivite ve kararlılık gösterme gibi cazip özellikleri sayesinde büyük ölçekli endüstriyel proseslerde tercih edilir olmuştur. Bu enzimlerin elde edildiği bakterilerin başında *Bacillus* cinsine ait türler gelmektedir [3, 4].

Selülozlar, biyoyakıtlar ve biyorafineri endüstrisinde, tekstilde, ilaç endüstrisinde, deterjan endüstrisinde, gıda ve yem endüstrisinde kullanılan oldukça önemli bir enzim grubu olup, küresel enzim pazarının yaklaşık olarak %20'sini oluşturmaktadırlar [5]. Selülitik enzimler, meyve suyu berraklaştırma gibi gıda işleme endüstrileri için oldukça faydalı enzimlerdir. Enzim uygulaması, meyvenin suyunu çıkarma sürecini kolaylaştırmakta, ürünün kalitesini artırmakta ve meyve suyu üretim süreçlerinde maliyet tasarrufu sağlamaktadır. Bitki hücre duvarlarının enzimatik işleme parçalanması, hücrelerdeki bileşenlerin daha kolay açığa çıkmasını sağlamaktadır. Böylelikle yüksek verimde meyve suyu elde edilebilmektedir [6]. Enzimlerin kullanımı, meyve suyunun berraklığını arttırmasının yanında, içeceğin homojen olmasını sağlamakta ve içimini kolaylaştırmaktadır. Dolayısıyla tüketiciler tarafından ürünlerin daha iyi kabul görmesi sağlanmaktadır [7].

Meyvelerin yapısında bulunan pektin, nişasta, selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi polisakkaritler, meyve sularının mikrofiltrasyon yoluyla işlenmesi sırasında bulanıklığa sebep olmaktadır. Aynı zamanda membran yüzeyinde ve filtrede tutulan parçacıklar, filtrasyonun performansını azaltmaktadır [6]. Bunun yanı sıra, düşük oranda meyve suyu geri kazanımı, çökelme işleminin uzun sürmesi, düşük verim, zaman ve lezzet kaybı gibi dezavantajlar oluşmaktadır. Dahası, filtre yardımcıları ve durultma maddelerinin eklenmesi, renk, aroma ve lezzet değişikliği gibi istenmeyen durumlara yol açabilmektedir [3]. Meyve suyu işleme uygulamaları için sorun oluşturan bu olumsuz durumların üstesinden gelmek amacıyla üretim sürecinde pektinaz, amilaz, selülaz, hemiselülaz, ksilanaz, glukozidaz, amiloglukozidaz ve glukanaz gibi enzimler kullanılmaktadır.

Enzimler, meyvelerdeki polisakkaritlerin hidroliz edilmesini ve dolayısıyla meyve suyundaki bulanıklığın azalmasını, meyve suyunun berraklaştırılmasını, vizkozitesinin azaltılmasını ve depolama stabilitesinin artırılmasını kolaylaştırmaktadır [1, 8, 9]. Kompleks substratlardaki selülozdan yararlanmak ve zorlu endüstriyel proseslere dayanması için özellikle termostabil, asidofilik ve geniş pH aralığında aktivite gösterebilen selülozlara ihtiyaç vardır [2, 4, 10].

Bu çalışmada, doğal bir izolat olan *Bacillus* sp. S35 suşundan termostabil, asidik, geniş pH aralığında stabil kalan ve organik solventlere dirençli yeni bir selülaz enzimi izole edilmiştir. Karakterize edilen enzim; elma, üzüm ve şeftali sularının berraklaştırılması prosesinde kullanılmış ve enzimin meyve suyu endüstrisinde kullanılma potansiyeli araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. *Bacillus* sp. S35 Suşundan Selülaaz Üretimi

Laboratuvar suş koleksiyonunda yer alan *Bacillus* sp. S35'in selülaaz aktivitesini belirlemek amacıyla, suş, öncelikle pepton (10 g/L), et özütü (10 g/L), maya (5 g/L), ve glikoz (1 g/L) ihtiva eden ve pH'ı 6,0 olan sıvı besi yerine inoküle edilmiştir. Kültür, 30°C'de, 180 rpm'de ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Canlandırma işleminden sonra suş, pepton (5 g/L), maya (5 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L), NaCl (5 g/L), karboksimetil selüloz (CMC) (10 g/L) ve agar (15 g/L) içeren CMC-agar besi yerine [11, 12] (pH 6,0) ekilip, 30°C'lik etüvde 48 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda suşun selülaaz aktivitesini kalitatif olarak belirlemek için koloninin geliştiği besi yerinin üzerine %0,1'lik Kongo kırmızısı solüsyonu eklenmiş ve 15 dakika bekletilmiştir. Ardından boya dökülüp besi yerinin üzerine 1 M NaCl eklenerek suş kolonisi 15 dakika boyunca yıkanmıştır. Boyama işleminden sonra koloninin etrafında oluşan sarı renkli berrak zonun varlığı, suşun, selülaaz üretimi bakımından pozitif olduğunu göstermektedir [13, 14].

Selülaaz üreticisi olduğu belirlenen *Bacillus* sp. S35 suşunun 24 saatlik kültüründen, pepton (5 g/L), maya (5 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L), NaCl (5 g/L) ve karboksimetil selüloz (CMC) (10 g/L) içeren enzim üretim besi yerine %5 oranında inoküle edilmiştir. Kültür, 30°C'de, 180 rpm'de ve 72 saat inkübe edilerek suşun selülaaz üretmesi sağlanmıştır. Süre sonunda, kültür 7.000 rpm'de 20 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir [5]. İşlem sonunda elde edilen ve ekstraselüler selülaazı (S35 selülaaz) içeren süpernatant, ileriki çalışmalarda ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

2.2. Standart Enzim Aktivitesi Tayini

Aktivite tayininde, Santana ve arkadaşlarının çalışmasından [7] modifiye edilen yöntem kullanılmıştır. Standart enzim aktivitesini 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemiyle tayin edilmiştir [15]. Bu amaçla, 0,2 mL ham selülaaz ve 0,2 mL 0,2 M sitrat fosfat tamponu (pH 5,0 ve %1 CMC substratını içeren) karıştırılarak 40°C'deki su banyosunda 60 dakika inkübe edilmiştir. Karışıma, 0,4 mL DNS reaktifi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Karışım, 100°C'de 10-15 dakika inkübe edilmiştir. Oluşan rengin absorbansı 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

2.3. pH ve Sıcaklığın, Selülaazın Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerindeki Etkileri

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için 0,2 M konsantrasyonda hazırlanan ve %1 CMC substratı içeren sitrat-fosfat (pH 4,0 ve 5,0), sodyum fosfat (pH 6,0-8,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0 ve 10,0) tampon çözeltileri kullanılmıştır. Analizde, 0,2 mL selülaaz ve 0,2 mL farklı pH'lardaki tamponlar 30°C'de 1 saat su banyosunda inkübe edilmiştir. Reaksiyon süresinin ardından standart enzim aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. En yüksek rölatif aktivite değeri gösteren değer (%100) optimum pH olarak belirlenmiştir [16]. Enzimin pH stabilitesinin tayini amacıyla, enzim ile 0,2 M konsantrasyonda hazırlanan ve substrat içermeyen sitrat-fosfat (pH 4,0 ve 5,0), sodyum fosfat (pH 6,0-8,0) ve glisin-NaOH (pH 9,0 ve 10,0) tampon çözeltileri eşit hacimde karıştırıldıktan sonra 1 saat 25°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra, standart enzim aktivite tayini gerçekleştirilerek enzimin farklı pH'lardaki kalan aktivite değerleri, kontrol ile kıyaslanarak hesaplanmıştır. Kontrol olarak enzimin optimum pH ve sıcaklıktaki aktivite değeri (%100) kullanılmıştır [17].

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin tespiti için, 0,2 mL selülaaz ve 0,2 mL substratlı pH 5,0 tamponu karıştırılarak 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60°C'lerdeki sıcaklıklarda 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından standart enzim aktivite analizleri yapılmıştır [18]. Enzimin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için, 1 mL selülaaz, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60°C'lerdeki sıcaklıklarda ön inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, her sıcaklıktaki enzim örneğinden alınıp, enzimin optimum aktivite koşullarında standart enzim aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. Enzimin kalan aktivite değerleri, kontrol ile kıyaslanarak hesaplanmıştır. Kontrol, enzimin optimum pH ve sıcaklıktaki aktivite değeridir (%100) [12].

2.4. Çeşitli Kimyasalların, Selülozun Aktivitesine Etkileri

Enzimin, çeşitli kimyasal ajanların varlığındaki aktivitesinin belirlenmesi amacıyla enzim, 5 mM konsantrasyondaki CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , HgCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 ve ZnCl_2 gibi metal klorür tuzlarıyla, 1 mM konsantrasyondaki iyodoasetamid, 1,10-fenantrolin, fenilmetilsülfonil florür (PMSF), etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve etilen glikol tetraasetik asit (EGTA), 2,5 mM N-alfa-tosil-L-lizin klorometil keton (TLCK) ve %10 β -merkaptotanol gibi çeşitli inhibitör ve şelatör maddelerle, aseton, asetonitril, *n*-bütanol, etanol, izopropanol, gliserol ve metanol çeşitli organik çözücülerin %10'luk konsantrasyonlarıyla 1 saat 25°C'de inkübe edilmiştir. Ön inkübasyonun ardından, enzimin kalan aktivitesi standart enzim aktivite tayiniyle belirlenmiştir. Kontrol olarak, kimyasallara maruz kalmamış enzimin optimum pH ve sıcaklıktaki aktivite değeri kullanılmıştır (%100) [3, 5, 12, 19].

2.5. Meyve Suyunun Berraklaştırılmasında Selülozun Etkisi

Meyve sularının çıkarılması için çalışmada kullanılan elma, üzüm ve şeftali meyveleri, Adana'daki (Türkiye) yerel bir marketten temin edilmiştir. Öncelikle musluk suyunda iyice yıkannan meyvelerin kabukları soyulup çekirdekleri elle ayrılmıştır. Ardından meyveler dilimlenerek ev tipi öğütücü yardımıyla öğütülmüştür. Oluşan meyve posasından meyve suyunun ayrıştırılması için öğütülmüş posa, temiz bir tülbentten süzölmüştür. Elde edilen meyve suları, deneyde kullanılmak üzere steril cam şişelere aktarılmıştır [18, 20].

Meyve suları ve S35 selüloz, çeşitli konsantrasyonlarda karıştırılmıştır. Meyve suyu:S35 selüloz enzimi karışım oranları 1:1 (v:v) ve 1:5 (v:v) olarak belirlenmiştir. Her karışım 40°C'de 100 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonların 1. saatinde ve 3. saatinde örnekler alınarak, hem meyve suyunun berraklık analizi (%Clarity, %C) hem de indirgen şeker miktarı analizi (DNS yöntemiyle) yapılmıştır [5].

Meyve suyu berraklığının analizi için geçirgenlik ölçümü (%Transmitans, %T) UV-visible spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda distile suya karşı yapılmıştır. Yüzde geçirgenlik (%T), meyve suyu berraklığının bir ölçüsü olarak kabul edilmiştir. Kontrol olarak, enzimle işlem görmemiş meyve suyu kullanılmıştır. Berraklık (%C) hesaplamada kullanılan formül aşağıdaki gibidir [5, 20, 21]:

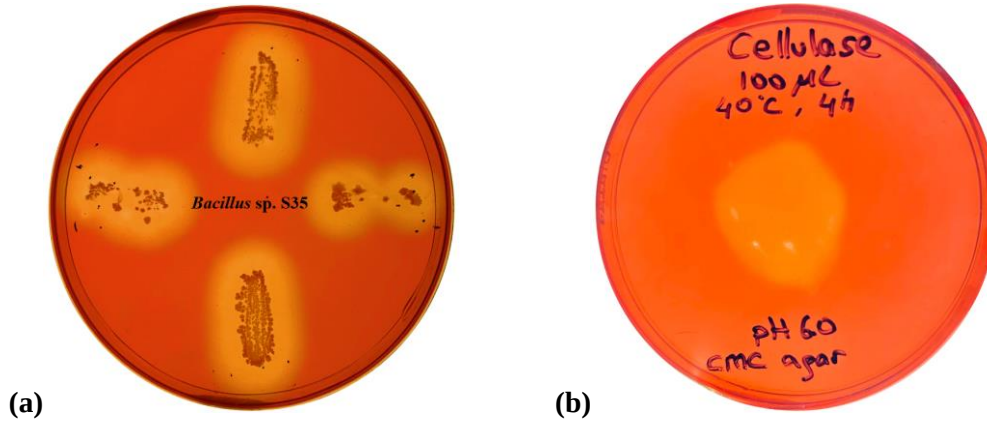
$$\%C = \frac{T_1 - T_2}{T_2} \times 100 ,$$

T1 = Meyve suyu ve enzim karışımının inkübasyon sonrası transmitansı,
T2 = Enzim içermeyen meyve suyunun transmitansı (kontrol).

İnkübasyon sonrası enzim-meyve suyu reaksiyonu sonucunda açığa çıkan indirgen şeker miktarının tayini amacıyla, örneklerin absorbansı 540 nm dalga boyunda kör tüpüne karşı (enzim içermeyen meyve suyu) ölçölmüştür [8, 18].

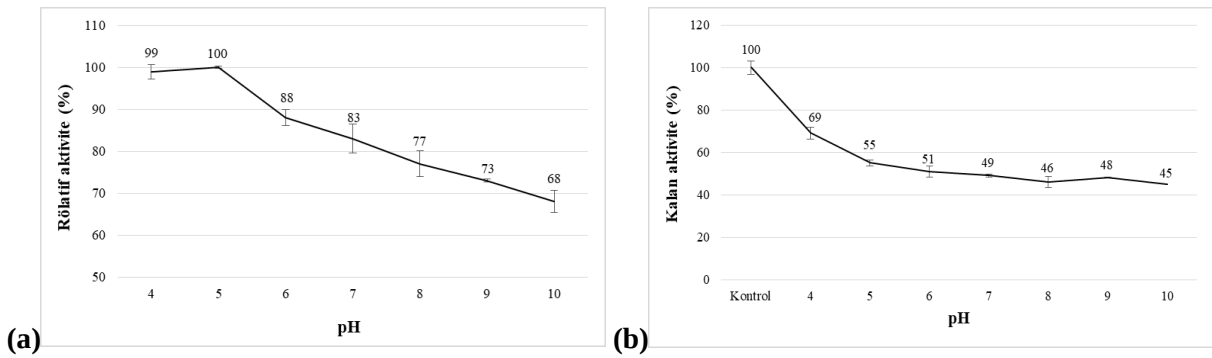
3. BULGULAR

Çalışmamızda, karakterizasyonunu yaptığımız ve meyve suyu berraklaştırma analizinde kullandığımız selülozun üreticisi *Bacillus* sp. S35 suşunun koloni morfolojisi ile CMC substratını içeren katı besi yerindeki selüloz aktivitesi *Şekil 1a*'da gösterilmiştir. S35 suşundan izole edilen S35 selüloz enziminin CMC içeren katı besi yerindeki aktivitesini belirlemek amacıyla, enzim pH'ı 6,0 olan CMC-agar besi yerine damlatılmıştır (100 μL). Enzimin, 40°C'de 4 saatlik inkübasyonu sonucundaki hidrolitik aktivitesi *Şekil 1b*'de gösterilmiştir.



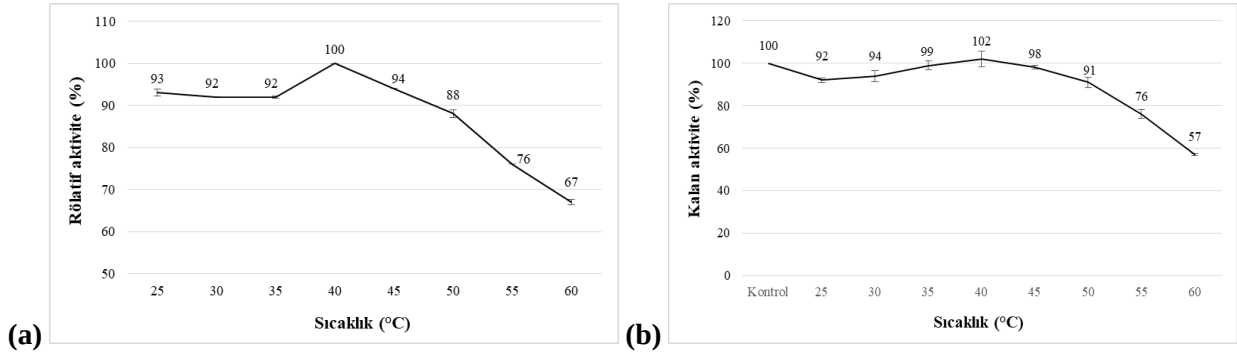
Şekil 1. (a) *Bacillus sp. S35* suşunun CMC-agar besiyerindeki koloni morfolojisi ve selüloz aktivitesi, **(b)** S35 selülazın CMC-agar besiyerindeki aktivitesi

Şekil 2a’da S35 selülazın optimum aktivitesine ait grafik yer almaktadır. Enzim optimum aktivitesini pH 5,0’te göstermiştir. Enzimin, pH 4,0 ve 6,0’da da, sırasıyla, %99 ve %88 oranlarında oldukça yüksek rölatif aktivite sergilediği gözlemlenmiştir. Bu bulgulara göre, bakteriyel kökenli selülazın asidik karakterde bir enzim olduğu belirlenmiştir. Enzim pH 7,0’de %83 oranında aktivite sahipken, alkali koşullarda (pH 8,0-10,0) ortalama %73 rölatif aktivite sergilemiştir. pH stabilite profiline göre S35 selülaz, 60 dakika boyunca pH 4,0 ve 5,0’te ortalama %62 oranında stabil kalmıştır (Şekil 2b). Ayrıca alkali pH değerlerinde ortalama %46,3 oranında kararlılık sergilemiştir. Grafikteki bulgulara göre, selülaz geniş aralıktaki pH değişimlerine dayanıklı ve karardır. Bu değerlere göre, enzim, başta asidik koşulların olduğu prosesler olmak üzere, nötral ve alkali koşullarda gerçekleşen selülaz aracılı birçok endüstriyel uygulamada yer alabilir niteliktedir.



Şekil 2. pH’in, selülazın aktivitesi (a) ve stabilitesi (b) üzerine etkileri

S35 selülaz, maksimum aktivitesini 40°C’de göstermiştir. 25-45°C aralığında ortalama %95,3 oranında rölatif aktivite sergileyen enzimin mezofilik karakterde olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3a). Enzim, 45-55°C aralığında ortalama %86 oranında rölatif aktiviteye sahip olup, termofilik özelliktedir. Enzimin aktivitesi 55°C’den sonra düşüşe geçmekle birlikte, 60°C’de %67 oranında ölçülmüştür. Selülazın termal kararlılığına ait bulgular Şekil 3b’de yer almaktadır. Enzim, 60 dakika süreyle 25-50°C aralığındaki çeşitli sıcaklıklara maruz bırakıldığında aktivitesinin neredeyse tamamını korumuştur. Maksimum stabilitesini optimum sıcaklık değeri olan 40°C’de göstermekle birlikte, 25-50°C aralığında ortalama %96 oranında stabil kalmıştır. Elde edilen bulgular, enzimin geniş bir sıcaklık skalasında çok yüksek oranda stabilitesini koruduğunu, termostabil ve termotolerant karakterde bir enzim olduğunu göstermektedir. Bu stabilite özelliği sayesinde, termal koşullardaki proseslerde kullanım potansiyeli yüksek bir adaydır. Enzim, yüksek sıcaklık uygulamalarına sahip proseslerdeki kullanılabilir potansiyeline ek olarak, 25°C ve 30°C gibi düşük sıcaklıklardaki endüstriyel uygulamalarda da tercih edilebilir. Bu düşük sıcaklıklardaki kararlılığı ise, enzimin, soğuga adapte bir selülaz olduğunu göstermektedir.



Şekil 3. Sıcaklığın, selülazın aktivitesi (a) ve stabilitesi (b) üzerine etkileri

S35 selülazın; çeşitli metal iyonlarının, inhibitörlerin, şelatörlerin ve organik çözücülerin varlığında göstermiş olduğu aktivite değerleri Çizelge 1’de sunulmuştur.

Ca^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} ve Zn^{+2} varlığında enzim aktivitesini neredeyse tamamen koruyarak, sırasıyla, %89, %82, %88 ve %89 oranlarında stabil kalmıştır. Co^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının enzimin aktivitesini, sırasıyla, %34 ve %30 oranlarında arttırması, S35 enziminin yapısal stabilitesini korumada rol aldıklarını göstermektedir [19]. Enzimin, metal iyonlarına karşı doğal bir dirence sahip olması, onu bu tür iyonların yer aldığı endüstriyel proseslerde kullanılmasına avantaj sağlamaktadır [10]. Ayrıca, Hg^{+2} selülazın aktivitesini %51 oranında inhibe etmiştir. Hg^{+2} iyonunun selülaz aktivitesini inhibe etmesi, enzimin yapısındaki tiyol gruplarına bağlanmasıyla ve enzimdeki triptofan ya da amino asit kalıntılarının karboksil grubu ile etkileşiminden kaynaklı olabileceği bildirilmiştir [16, 22]. Bu sebeple enzimin protein konformasyonu değişir ve enzim inaktif olur [18].

%0,02 β -merkaptöetanol ve 1 mM iyodoasetamid gibi inhibitörlerin varlığında selülaz, aktivitesinin tamamını korumuştur. Bu duruma göre, enzimin aktif bölgesinde sistein kalıntılarının bulunmadığı ya da uzakta olduğu, enzimin katalitik aktivitesi için -SH gruplarının gerekli olmadığı anlaşılmaktadır [16, 23]. İnhibitör bir ajan olan 1 mM PMSF varlığında selülazın aktivitesini %87 oranında koruması ve aktivitedeki düşük orandaki inhibisyon, enzim aktif bölgesinde bloke olan serin kalıntılarının az miktarda olduğunu düşündürmektedir [24]. 1 mM TLCK’ye maruz kalan selülaz, %55 oranında aktivite kaybı yaşamıştır. 1 mM 1,10-fenantrolin inhibitörünün varlığında selülaz aktivitesinin %85’ini koruduğu tespit edilmiştir. 1 mM EDTA ve 1 mM EGTA gibi şelatlayıcı ajanların varlığında, sırasıyla, %72 ve %96 oranında stabil kalmıştır.

EDTA’nın, selülazın aktivitesi için gerekli olan bazı metal iyonlarını şelatladığı, metal iyonlarını uzaklaştırması sebebiyle de enzimin aktivitesinde azalma meydana geldiği ve konformasyonel stabilitesinin etkilendiği tespit edilmiştir [24]. Bu durum, S35 selülazın bir metaloprotein olduğunu ve katalitik aktivitesi için bazı metal iyon kofaktörlerine ihtiyaç duyduğunu düşündürmektedir [10, 12].

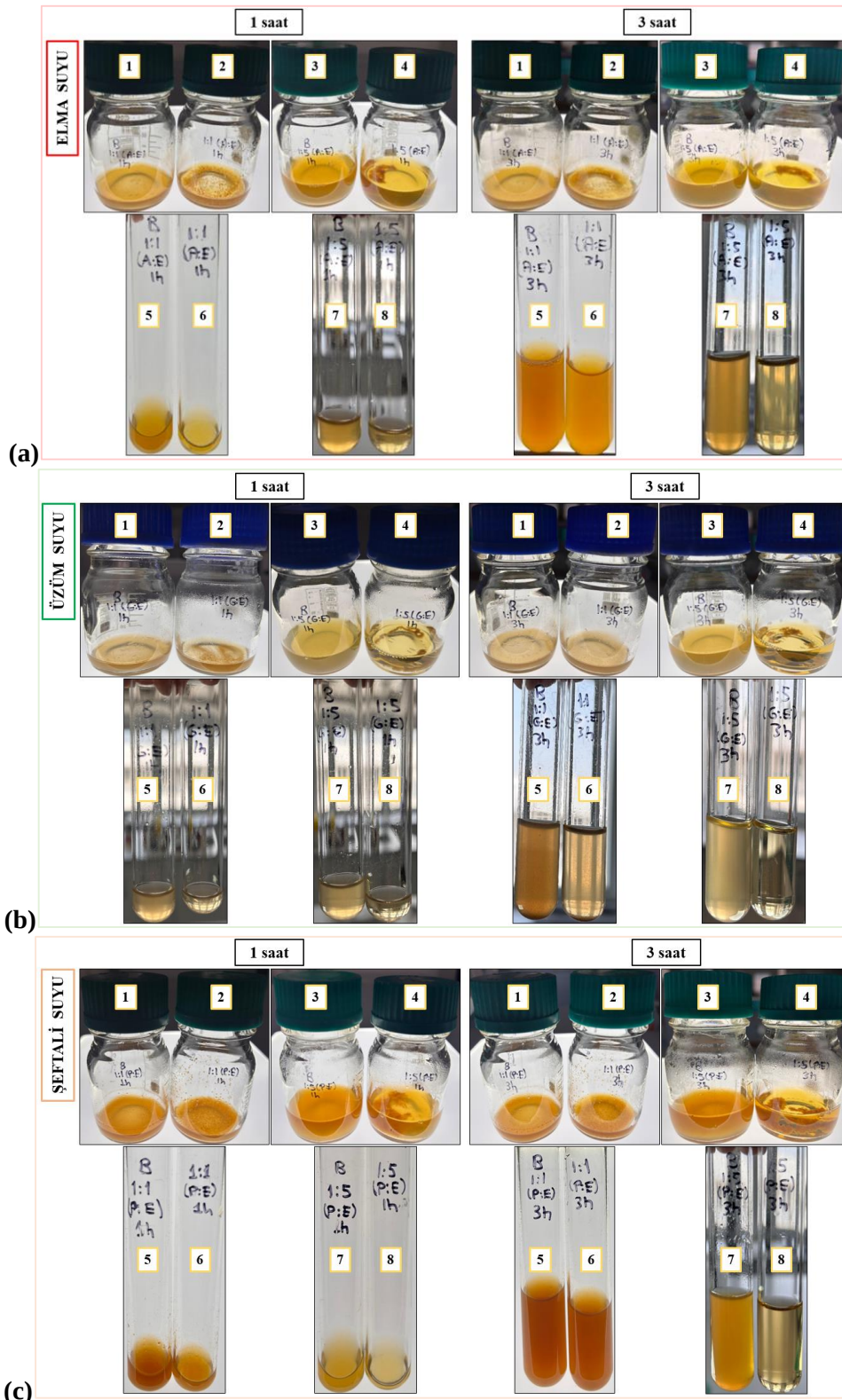
S35 selülazın aktivitesi, %10 konsantrasyondaki organik çözücülerden aseton, asetonitril, *n*-bütanol, etanol, gliserol, izopropanol ve metanol varlığında, sırasıyla, %89, %77, %70, %84, %64, %80 ve %77 oranlarında korunmuş ve enzim orta düzeyde inhibe olmuştur. Enzimin organik çözücülerin varlığındaki stabilitesi, çözücülerin yapısına bağlıdır. Enzimin korunan ya da artan stabilitesi, polar olmayan hidrofobik çözücü kalıntılarının, enzimin aktivitesini uyaran bir arayüz sağlamasından kaynaklanıyor olabilir [25]. Enzimdeki bazı su moleküllerinin organik moleküllerle değiştirilmesi, enzimin yapısını stabilize edebilir [26].

Çizelge 1. Kimyasalların, selülazın aktivitesi üzerine etkileri

Kimyasallar	Konsantrasyon	Kalan aktivite (% $\pm$ SS*)
Kontrol	-	100
Metal iyonları		
Ca^{+2}	5 mM	$89 \pm 0,98$
Co^{+2}	5 mM	$134 \pm 1,79$
Cu^{+2}	5 mM	$82 \pm 0,02$
Hg^{+2}	5 mM	$49 \pm 4,67$
Mg^{+2}	5 mM	$88 \pm 1,94$
Mn^{+2}	5 mM	$130 \pm 5,27$
Zn^{+2}	5 mM	$89 \pm 0,84$
İnhibitörler / Şelatörler		
β -merkaptotanol	%0.02	110 ± 0
İyodoasetamid	1 mM	$96 \pm 0,04$
Fenilmetilsülfonil florür (PMSF)	1 mM	$87 \pm 1,91$
Tosillizin klorometilketon (TLCK)	1 mM	$45 \pm 0,56$
1,10-fenantrolin	1 mM	$85 \pm 0,16$
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	1 mM	72 ± 0
Etilen glikol-bis(β -aminoetil eter)- N,N,N',N'-tetraasetik asit (EGTA)	1 mM	$96 \pm 1,21$
Organik çözücüler		
Aseton	%10	$89 \pm 1,77$
Asetonitril	%10	$77 \pm 3,83$
n-Bütanol	%10	$70 \pm 0,84$
Etanol	%10	$84 \pm 1,56$
Gliserol	%10	64 ± 0
İzopropanol	%10	$80 \pm 1,84$
Metanol	%10	$77 \pm 3,66$

*SS: standart sapma

Selülazlar, içecek endüstrisinde meyve sularının berraklaştırılması proseslerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda, elma, üzüm ve şeftali suları ile S35 selülaz enzimi, iki farklı oranda karıştırıldıktan sonra, 1 saat ve 3 saat sürelerde 40°C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda, kontrol tüpleriyle (enzim içermeyen meyve suyu) kıyaslanarak yapılan görsel değerlendirmede, enzimin tüm meyve sularında oldukça yüksek oranda berraklaşma sağladığı açıkça gözlemlenmiştir (*Şekil 4*). Görsel incelemede, elma suyundaki en iyi berraklaşmanın, 1:5 oranında hazırlanmış meyve suyu:enzim karışımının 3 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edildiği belirlenmiştir (*Şekil 4a*). Üzüm suyu ile yapılan analizde ise, en iyi berraklaşma 1:5 oranında hazırlanmış meyve suyu:enzim karışımının 3 saatlik inkübasyonu sonucunda meydana gelmiştir (*Şekil 4b*). Şeftali suyuyla gerçekleştirilen uygulamada da en iyi berraklaşma, 1:5 oranında hazırlanmış meyve suyu:enzim karışımının 3 saatlik inkübasyonunda görülmüştür (*Şekil 4c*). Her meyve suyuna ait analizdeki 6 ve 8 numaralı tüpler karşılaştırıldığında, 3 saatlik inkübasyonlar sonucundaki berraklaşmanın ne kadar iyi oranda olduğu görülmektedir.



Şekil 4. Meyve suyu berraklaştırmada selülozün aktivitesi. Elma (a), üzüm (b) ve şeftali (c) sularının berraklaştırılmasında S35 selülozün etkisi.

1-Kontrol (1:1 meyve suyu:distile su, 1 saatlik inkübasyon), 2-1:1 meyve suyu:enzim, 1 saatlik inkübasyon, 3-Kontrol (1:5 meyve suyu:distile su, 1 saatlik inkübasyon), 4-1:5 meyve suyu:enzim, 1 saatlik inkübasyon, 5-1 no'lu şişeden alınan üst faz, 6-2 no'lu şişeden alınan üst faz, 7-3 no'lu şişeden alınan üst faz, 8-4 no'lu şişeden alınan üst faz.

(B: kontrol, E: enzim, A: elma, G: üzüm, P: şeftali, 1h: 1 saat, 3h: 3 saat)

Çizelge 2’de, S35 selülaazın elma, üzüm ve şeftali sularını berraklaştırması sonucunda elde edilen geçirgenlik (%T) ve berraklık (%C) oranları verilmiştir. 1:1 ve 1:5 olacak şekilde meyve suyu:enzim oranlarında karışımlar hazırlanarak 1 saatlik ve 3 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonlar sonucunda, karışımlardan ve kontrollerden (enzim içermeyen meyve suyu) numuneler alınıp 660 nm dalga boyunda transmittans ölçümü yapılmıştır. Spektrofotometredeki her ölçüm, distile suya karşı yapıldıktan sonra örneklerin geçirgenlikleri belirlenerek %T değerleri kaydedilmiştir. Elde edilen %T değerleriyle berraklık formülüne göre hesaplamalar yapıldıktan sonra her meyve suyuna ait %C değerleri hesaplanmıştır. İnkübasyon süreleri kıyaslandığında meyve sularının berraklıklarında meydana gelen artış-azalış değerleri Çizelge 2’de “%C ↑↓” kolonunda belirtilmiştir.

Meyve sularının berraklık analizi bulgularına göre, elma suyunda, 1:1 oranındaki MS:S35 selülaaz karışımının 1 saatlik inkübasyonunda en yüksek berraklık değeri ölçülmüştür (%366,7). Bu değer, üzüm suyu için 1:5 oranındaki MS:S35 karışımının 1 saatlik inkübasyonunda en yüksek olup (%203,1) şeftali suyunda ise, 1:5 oranındaki MS:S35 karışımının 3 saatlik inkübasyonunda en yüksektir (%1421).

Çizelge 2. Meyve suyunun berraklık analizi (%T ve %C değerleri)

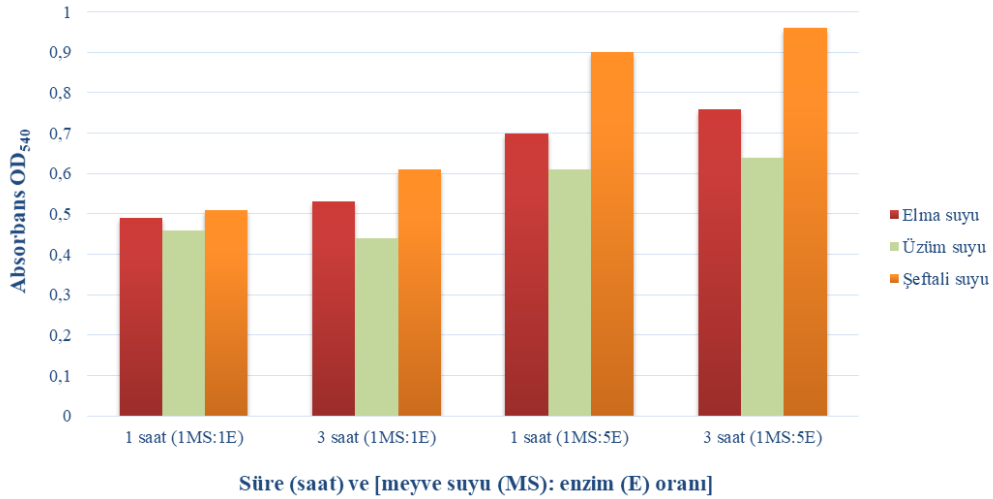
Meyve Suyu Çeşidi	MS:S35 oranı (v:v)	1 saat			3 saat			%C ↑↓
		Kontrol %T	MS + S35 %T	%C	Kontrol %T	MS + S35 %T	%C	
Elma suyu	1:1	4,2	19,6	366,7	2,5	7,3 ± 0,3	196	%47 ↓
	1:5	27,7	48,4	74,73	21,3	61,4 ± 0,64	189	%153 ↑
Üzüm suyu	1:1	34,9	75,4	116,05	31	59,3 ± 0,23	91,4	%21,24 ↓
	1:5	29,5	89,4	203,1	34,9	93,3 ± 0,15	167	%18 ↓
Şeftali suyu	1:1	0,6	0,9	50	0,63	1,1 ± 0	74	%48 ↑
	1:5	9	35,9	299	5,8	88,23 ± 0,06	1421	%375,3 ↑

Enzim-meyve suyu karışımı örneklerinden, inkübasyonların 1. saat ve 3. saatleri sonunda alınan örneklerle DNS yöntemine göre 540 nm dalga boyunda gerçekleştirilen indirgen şeker analizi sonuçları Şekil 5’te gösterilmiştir.

Elma suyunun geçirgenlik analizine göre en iyi sonuç, 1:5 oranında hazırlanan elma suyu:S35 selülaaz karışımının 3 saatlik inkübasyonunda elde edilmiştir. Elde edilen verim, 1:5 oranındaki elma suyu:S35 selülaaz karışımının 1 saatlik inkübasyonundaki ürün veriminden %9, 1:1 oranındaki elma suyu:S35 selülaaz karışımının 3 saatlik inkübasyonundaki ürün veriminden %43,4 ve 1:1 oranındaki elma suyu:S35 selülaaz karışımının 1 saatlik inkübasyonundaki ürün veriminden %55,1 daha fazladır.

Üzüm suyunun geçirgenlik analizine göre en iyi sonuç, 1:5 oranında hazırlanan üzüm suyu:S35 selülaaz karışımının 3 saatlik inkübasyonunda elde edilmiştir. Elde edilen verim, 1:5 oranındaki üzüm suyu:S35 selülaaz karışımının 1 saatlik inkübasyonundaki ürün veriminden %5, 1:1 oranındaki üzüm suyu:S35 selülaaz karışımının 3 saatlik inkübasyonundaki ürün veriminden %45,5 ve 1:1 oranındaki üzüm suyu:S35 selülaaz karışımının 1 saatlik inkübasyonundaki ürün veriminden %39,1 daha fazladır.

Şeftali suyunun geçirgenlik analizine göre en iyi sonuç, 1:5 oranında hazırlanan şeftali suyu:S35 selülaaz karışımının 3 saatlik inkübasyonunda elde edilmiştir. Elde edilen verim, 1:5 oranındaki şeftali suyu:S35 selülaaz karışımının 1 saatlik inkübasyonundaki ürün veriminden %7, 1:1 oranındaki şeftali suyu:S35 selülaaz karışımının 3 saatlik inkübasyonundaki ürün veriminden %57,4 ve 1:1 oranındaki şeftali suyu:S35 selülaaz karışımının 1 saatlik inkübasyonundaki ürün veriminden %88,2 daha fazladır.



Şekil 5. Meyve suyundaki indirgen şeker analizi

4. TARTIŞMA

Selülozlar, endüstriyel ve biyoteknolojik olarak oldukça değerli enzimlerdir. Temel olarak selülozun hidrolizinden sorumlu enzimler olup, meyve suyu berraklaştırma proseslerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Meyve suyunun berraklaştırılması, meyve suyu ve içecek endüstrisinde içeceğin görseelliğini ve pazarlanabilirliğini artıran önemli bir aşamadır. Literatürde yer alan birçok çalışma, farklı meyve sularının berraklaştırılmasında kullanılmak üzere karakterizasyonu yapılan çeşitli mikrobiyal selüloz enzimlerini kapsamaktadır.

Doan ve arkadaşları [5], yaptıkları çalışmada *Paenibacillus elgii* TKU051 suşundan elde ettikleri PeCel selüloz enziminin pH 6,0 ve 60°C'de optimum aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Enzim, 50°C'de 1 saat boyunca aktivitesinin yaklaşık %80'ini, pH 4,0-10,0 aralığında stabilitesinin tamamına yakını korumuştur. Na⁺, K⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺ ve Mg²⁺ varlığında enzimin başlangıç aktivitesi korunmuştur. Cu²⁺ iyonu ile önemli ölçüde inhibe olan enzimin aktivitesi, Mn²⁺ varlığında %40 oranında artmıştır. 2-ME, EDTA, 1,10-fenantrolin ve PMSF ile enzim yaklaşık %80'in üzerinde stabil kalmıştır. Yaptıkları meyve suyu berraklaştırma analizinde 0 U, 1 U, 5 U ve 10 U miktarlarındaki PeCel selülozu elma suyu ile inkübasyona bıraktıklarında meyve suyunun berraklığının, sırasıyla, %34,54 ± 0,62; %62,52 ± 1,54; %68,19 ± 1,85 ve %71,33 ± 1,92 oranlarında arttığını rapor etmişlerdir. Sonuç olarak, izole ettikleri selülozun, elma suyu berraklığını arttırdığını ve dolayısıyla meyve suyu endüstrisinde kullanım potansiyelinin yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda karakterize etmiş olduğumuz S35 selüloz enzimi, elma suyunu, 1:5 meyve suyu: enzim oranındaki karışımlarda 1 saatlik inkübasyonda %74,73 ve 3 saatlik inkübasyonda %189 oranlarında berraklaştırarak PeCel selülozun berraklaştırma oranından daha yüksek aktivite sergilemiştir (Çizelge 2).

Widowati ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada, *Bacillus subtilis* suşundan izole ettikleri selüloz enzimini kırmızı guava suyunun berraklaştırılmasında kullanmışlardır [27]. Enzim pH 3,0-9,0 aralığında stabilitesini korumuştur. Çalışmada 35°C, 47,5°C ve 60°C sıcaklıklarda 60, 90 ve 120 dakikalık inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sıcaklığının meyve suyunun geçirgenliği üzerinde önemli bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Sıcaklık artışının, meyve suyunun berraklaşmasında enzimatik reaksiyonu hızlandırdığı tespit edilmiştir. 35°C'deki inkübasyona kıyasla, 47,5°C'deki inkübasyon sonunda meyve suyunun geçirgenliği artmıştır. 47,5°C ve 60°C'deki inkübasyonlar sonucunda elde edilen geçirgenlik değerleri arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Meyve suyunda berraklaşma analizinde en yüksek %T değerini 47,5°C'deki 90 dakikalık inkübasyon sonucunda (%23,27) elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda meyve suyu berraklaştırma analizinde kullandığımız meyve suyu türleri farklı olmakla birlikte, S35 selülozun, bu çalışmadaki bulgulara kıyasla daha yüksek %T değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2).

Abdella ve Ibrahim, *Bacillus licheniformis* MA1 suşundan elde ettikleri ham selüloz enzimiyle elma suyunun berraklaştırılması analizini gerçekleştirmişlerdir. Enzimin standart aktivitesini pH 7,0'de ve 40°C'de ölçmüşlerdir. 50 dakikalık inkübasyon süresi sonunda meyve suyu berraklaştırma testinden elde ettikleri veriler, enzimle muamele edilmiş meyve suyu örneğinde (%88,2 ± 0,15), kontrol meyve suyuna (%75,4 ± 0,09) kıyasla, verimin dikkate değer bir oranda arttığını göstermiştir. Enzimin, elma suyunda berraklaştırıcı madde olarak kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir [13]. S35 selüloz, bu çalışmadaki bulgularla benzerlik göstermekle birlikte, enzimimizin pH 5,0'te optimum aktivite sergilemesi sayesinde meyve suyu endüstrisindeki asidik proses koşullarına daha uygun olacağını ve berraklaştırıcı madde olarak tercih edilebileceğini düşünmekteyiz.

Bhattacharya ve arkadaşları, çalışmalarında karakterize ettikleri selüloz enziminin maksimum aktivitesini pH 5,0'te ve 50°C'de gösterdiğini belirlemişlerdir. Enzimin, 30-80°C ve pH 2,0-9,0 aralığındaki değerlerdeki kararlılığını belirlemişlerdir. Selülazın, pH 3,0-6,0 aralığında 4 saatlik inkübasyondan sonra %90-99 kalan aktivite değerine sahip olduğunu, pH 7,0'de ise aktivitesinin %80'ini koruduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin aktivitesi alkali koşullarda ise kademeli bir düşüş göstermiştir. 30, 40 ve 50°C'lerde 2 saatlik inkübasyondan sonra %90-99 aralığında aktivitesini koruyan enzim yüksek bir stabilite sergilemiştir. Bu stabilite özelliği enzimi, sıcaklığın genellikle 50°C civarında seyrettiği meyve suyu berraklaştırma gibi işlemler için uygun hâle getirmektedir [19]. Çalışmamızda karakterize ettiğimiz S35 selülazın da 50°C civarında sahip olduğu termal kararlılığı sayesinde meyve suyu endüstrisi için önemli bir aday olduğunu, literatürdeki farklı çalışmaların bulgularıyla yapılan kıyaslar da desteklemektedir. Çeşitli metal iyonlarının ve organik solventlerin, enzimin aktivitesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Cu⁺² ve Fe⁺² iyonlarının, enzimin aktivitesini inhibe ettiği bildirmişler, sırasıyla, %17,5 ve %18,26 oranında kalan aktivite değeri ölçmüşlerdir. Buna karşılık, enzimin aktivitesi Ca⁺², Co⁺² ve Na⁺ iyonları varlığında, sırasıyla, %87,79, %82,05 ve %86,34 oranlarında korunmuştur. Mg⁺² varlığında enzimin aktivitesi %28 artmıştır. Bu çalışmadaki selülaza kıyasla, S35 selülaz enzimi, Cu⁺² ve Mg⁺² varlığında aktivitesinin tamamına yakınına korumuş, Ca⁺² varlığında da benzer kararlılığı sergilemiştir (Çizelge 1). Çözücüler arasında metanol (%84,19), etanol (%83,10), izopropanol (%85,37), aseton (%82,78) ve gliserol (%88,66), selülaz aktivitesini orta düzeyde inhibe etmiştir. Çalışmalarında karakterize ettikleri selülaz, metanol (%84,19), etanol (%83,10), izopropanol (%85,37), aseton (%82,78) ve gliserol (%88,66) ile muamele edildiğinde enzimin aktivitesini orta düzeyde inhibe ederek S35 selülaz ile benzer aktivite değerleri göstermiştir (Çizelge 1). Karakterize ettikleri selülaz, elma suyunda, sadece meyve suyuna kıyasla, %42 oranında bir artışla %94,37 oranında berraklaşma sağlamıştır. İndirgen şeker miktarında da 50°C'deki 1,5 saatlik inkübasyonda %0,25'lik enzim:meyve suyu karışımında yaklaşık %63'lük bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu değerlerle kıyaslandığında, S35 selülazın elma, üzüm ve şeftali sularını berraklaştırma kabiliyetinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Çizelge 2, Şekil 5).

Kanmani ve arkadaşları, *Bacillus pumilus* suşundan elde ettikleri selülaz enzimini elma suyunun berraklaştırılmasında kullanmışlardır. 1 mL enzim ile 5 mL meyve suyu karışımını 50°C'de 50 dakika süreyle inkübasyona bıraktıktan sonra kontrol olarak hazırladıkları 1 mL su ile 5 mL meyve suyu karışımıyla kıyaslamışlardır. Yaptıkları görsel değerlendirmede enzim içeren elma suyunda berraklaşma tespit etmişlerdir. Meyve sularının bulanık olması, endüstriyel olarak istenmeyen bir durumdur. Tüketici, bulanık meyve sularına kıyasla berrak içecekler tüketmeyi tercih etmektedir. Dolayısıyla, içecek üreticileri, ürettikleri meyve sularını enzimatik yolla berraklaştırma yöntemlerini uygulamaktadır. Buna ek olarak, endüstriyel proseslerdeki zorlu koşullar altında enzimin stabilitesinin korunması, maliyette ve işlem süresinde azalma sağlayan en büyük etmenlerden biridir [28]. Çalışmamızda karakterize ettiğimiz ve meyve suyu berraklaştırma analizini gerçekleştirdiğimiz S35 selülaz enzimi; sahip olduğu termal stabilite ve asidik ortamda yüksek kararlılıkta olma, organik çözücülere karşı stabilitesini koruma ve çeşitli kimyasalların varlığında aktivitesini sürdürme gibi çeşitli özellikleri sayesinde meyve suyu işleme ve berraklaştırma proseslerine uygun bir enzim olduğunu göstermiştir. Bu kararlılık özellikleri, endüstriyel proseslerde enzimlerde aranan en önemli özelliklerdir.

Dolayısıyla, S35 selüloz enziminin, meyve suyu endüstrisinin yanı sıra, çeşitli çevre dostu proseslere de entegre edilebilir karaktere sahip olması, enzimin endüstriyel üretimde zararlı kimyasallara olan bağımlılığın azaltılmasına da katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Bu faydalı katkı, enzimin hem yenilikçi hem de özgün değerini ortaya koymaktadır. Ayrıca çalışmamızda, üç farklı meyve suyunda, iki farklı meyve suyu:enzim konsantrasyonunda ve iki farklı inkübasyon süresinde analiz etmiş olduğumuz meyve suyu berraklaştırma denemeleri, S35 selülazın yüksek verimlilikte meyve suyu berraklaştırma potansiyeli olduğunu göstermiştir. Hem görsel hem de kantitatif olarak değerlendirdiğimizde ve enzimin sahip olduğu karakteristik özellikleri göz önüne alındığında, enzimin meyve sularını berraklaştırma kapasitesi oldukça yüksektir. Doğal bakteri suşundan elde edilip ham enzim hâlinde kullanılmış olması da, onu, literatürdeki benzerlerinden ayıran önemli bir özellik olarak görülmektedir. Ayrıca, enzimin hem doğal bir suştan elde edilmesi, hem de geniş sıcaklık ve pH skalasında stabilitesini koruyor olması çalışmamızın özgün değerini artırmaktadır.

TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalışmanın araştırması veya yayınlanması ile ilgili herhangi bir finansal destek almamıştır.

YAZAR KATKI ORANLARI

Nihan Arabacı: Kavramlaştırma, Metodoloji, Araştırma, Materyal temini, Araştırma, Deney sonuçlarının doğruluğunu kontrolü, İçerik analizi, Makalenin yazımı-Orijinal taslak, Makalenin yazımı- İnceleme ve Düzenleme.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarın herhangi bir çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Bhardwaj, N., Kumar, B., Agrawal, K., and Verma, P. (2021). Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 95.
- [2] Ejaz, U., Sohail, M., and Ghanemi, A. (2021). Cellulases: from bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*, 6(3), 44.
- [3] Prajapati, J., Dudhagara, P., and Patel, K. (2021). Production of thermal and acid-stable pectinase from *Bacillus subtilis* strain BK-3: Optimization, characterization, and application for fruit juice clarification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102063.
- [4] Siu-Rodas, Y., de los Angeles Calixto-Romo, M., Guillén-Navarro, K., Sánchez, J. E., Zamora-Briseno, J. A., and Amaya-Delgado, L. (2018). *Bacillus subtilis* with endocellulase and exocellulase activities isolated in the thermophilic phase from composting with coffee residues. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(3), 234-243.
- [5] Doan, C. T., Tran, T. N., Pham, T. P., Tran, T. T. T., Truong, B. P., Nguyen, T. T., Nguyen, T. M., Bui, T. Q. H., Nguyen, A. D., and Wang, S. L. (2024). Production, purification, and characterization of a cellulase from *Paenibacillus elgii*. *Polymers*, 16(14), 2037.
- [6] Nehad, E. A., Yoness, M. F., and Reem, A. A. (2019). Optimization and purification of cellulase produced by *Penicillium decumbens* and its application. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 18(4), 391-402.
- [7] Santana, M. L., Bispo, J. A. C., de Sena, A. R., Teshima, E., de Brito, A. R., Costa, F. S., Franco, M., and de Assis, S. A. (2021). Clarification of tangerine juice using cellulases from *Pseudomyces* sp. *Journal of Food Science and Technology*, 58(1), 44-51.
- [8] Ozyilmaz, G., and Gunay, E. (2023). Clarification of apple, grape and pear juices by co-immobilized amylase, pectinase and cellulase. *Food Chemistry*, 398, 133900.
- [9] Singh, R., and Singh, R. K. (2015). Role of enzymes in fruit juices clarification during processing: A review. *International Journal of Biological Technology*, 6(1), 1-12.
- [10] Li, C., Kumar, A., Luo, X., Shi, H., Liu, Z., and Wu, G. (2020). Highly alkali-stable and cellulase-free xylanases from *Fusarium* sp. 21 and their application in clarification of orange juice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 572-580.
- [11] Kim, J. Y., Hur, S. H., and Hong, J. H. (2005). Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. *Biotechnology Letters*, 27(5), 313-316.

- [12] Regmi, S., Choi, Y. S., Kim, Y. K., Khan, M. M., Lee, S. H., Cho, S. S., Jin, Y. Y., Lee, D. Y., Yoo, J. C., and Suh, J. W. (2020). Endoglucanase produced by *Bacillus subtilis* strain CBS31: Biochemical characterization, thermodynamic study, enzymatic hydrolysis, and bio-industrial applications. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 25(1), 104-116.
- [13] Abdella, M. A., and Ibrahim, G. E. (2024). Application of statistical designs strategy to improve cellulase production using agro-waste residue by a novel isolate *Bacillus licheniformis* strain-MA1 and assessing the enzyme effect on apple juice quality. *BMC Microbiology*, 24(1), 511.
- [14] Ahmad, T., Sharma, A., Gupta, G., Mansoor, S., Jan, S., Kaur, B., Paray, B. A., and Ahmad, A. (2020). Response surface optimization of cellulase production from *Aneurinibacillus aneurinilyticus* BKT-9: an isolate of urban Himalayan freshwater. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(9), 2333-2343.
- [15] Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- [16] Gaur, R., and Tiwari, S. (2015). Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *BMC Biotechnology*, 15(1), 19.
- [17] Shankar, T., Sankaralingam, S., Balachandran, C., Chinnathambi, A., Nasif, O., Alharbi, S. A., Park, S., and Baskar, K. (2021). Purification and characterization of carboxymethylcellulase from *Bacillus pumilus* EWBCM1 isolated from earthworm gut (*Eudrilus eugeniae*). *Journal of King Saud University-Science*, 33(1), 101261.
- [18] Nagar, S., Mittal, A., and Gupta, V. K. (2012). Enzymatic clarification of fruit juices (apple, pineapple, and tomato) using purified *Bacillus pumilus* SV-85S xylanase. *Biotechnology and Bioprocess engineering*, 17(6), 1165-1175.
- [19] Bhattacharya, R., Arora, S., and Ghosh, S. (2024). Bioprocess optimization for food-grade cellulolytic enzyme production from sorghum waste in a novel solid-state fermentation bioreactor for enhanced apple juice clarification. *Journal of Environmental Management*, 358, 120781.
- [20] Naik, B., Kumar, V., Goyal, S. K., Tripathi, A. D., Khan, J. M., Irfan, M., Bhatt, S. C., Gupta, A. K., and Rustagi, S. (2023). Production, characterization, and application of novel fungal pullulanase for fruit juice processing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 248, 125936.
- [21] da Silva, P. O., de Alencar Guimaraes, N. C., Serpa, J. D. M., Masui, D. C., Marchetti, C. R., Verbisck, N. V., Zanoelo, F. F., Ruller, R., and Giannesi, G. C. (2019). Application of an endo-xylanase from *Aspergillus japonicus* in the fruit juice clarification and fruit peel waste hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101312.
- [22] Azadian, F., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., Karami, Z., and Hassanshahian, M. (2017). Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable cellulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversion of lignocellulosic wastes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 187-196.
- [23] Dorra, G., Ines, K., Imen, B. S., Laurent, C., Sana, A., Olfa, T., Pascal, C., Thierry, J., and Ferid, L. (2018). Purification and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by an endophytic *Bacillus halotolerans* strain CT2. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 342-351.
- [24] Mechri, S., Berrouina, M. B. E., Benmrar, M. O., Jaouadi, N. Z., Rekik, H., Moujehed, E., Chebbi, A., Sayadi, S., Chamka, M., Bejar, S., and Jaouadi, B. (2017). Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 221-232.
- [25] Yilmaz, A. A., and Gurkok, S. (2025). Biotechnological uses of purified and characterized alkaline cellulase from extremophilic *Bacillus pumilus* VLC7 from Lake Van. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 60.
- [26] Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., and Nasri, M. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(5), 513-518.
- [27] Widowati, E., Sanjaya, A. P., Sari, A. M., and Ambarwati, S. (2021). Effect of partially purified polygalacturonase and cellulase on red guava juice clarification at various incubation times and temperatures. *Agritech*, 41(2), 145-151.
- [28] Kanmani, R., Vijayabaskar, P., and Jayalakshmi, S. (2011). Saccharification of banana-agro waste and clarification of apple juice by cellulase enzyme produced from *Bacillus pumilis*. *World Applied Sciences Journal*, 12(11), 2120-2128.