Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi Yıl:2012 Cilt:27-5

YERELMASI YETİŞTİRİLEN TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus* sp. YET-1 SUŞUNA AİT CMCaz ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU*

Characterization of CMCase of Bacillus sp. YET-1 Isolated from Jerusalem Artichoke Field

Ali COŞKUN
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Numan ÖZCAN
Zootekni Bölümü

ÖZET

Bu çalışmada Adana'da yerelması yetiştiriciliği yapılan topraklardan CMCaz üreten termofilik *Bacillus* sp. YET-1 suşunun izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Termofilik *Bacillus* sp. YET-1 suşunun ürettiği CMCaz enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık 48 kDa olarak bulunmuştur. CMCaz enziminin termostabilitesi 90 °C'de orijinal aktivitenin %70'ini korurken, optimum sıcaklık ve pH'sı sırasıyla 50 °C ve 7.0 olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, CMCaz, termofil, karakterizasyon, β(1,4) glukanaz

ABSTRACT

In this study, CMCase producing *Bacillus* sp. strain YET-1 was isolated and characterized from Jerusalem artichoke field of Adana.

Thermophilic *Bacillus* sp. strain YET-1 produce thermostable CMCase with molecular weight of approximately 48 kDa and thermostability of the CMCase were maintened up to %70 of originale activity at 90 °C. Optimum temperature and pH of the CMCase 50 °C and 7.0, respectively.

Key Words: *Bacillus*, CMCase, thermophile, characterization, β(1,4) glucanase

Giriş

Selüloz lignin ve hemiselülozlarla birlikte doğada en çok bulunan organik bileşiklerden biri olup, bu üç polimer bitki ve ağaçların ana yapısını oluşturmaktadırlar (Wynne ve Pemberton, 1986). Yaygın olarak bitki hücre duvarlarında bulunan selüloz, glikoz birimlerinin β-1,4 glikozidik bağlarla bağlanmasıyla oluşur (Bhat, 2000).

Selülozu parçalayan enzimler üç ana grup altında sınıflandırılırlar: endoglukanazlar (β-1,4-D-glukan sellobiohidrolaz), ekzoglukanazlar (β-1,4-D-glukan glukanohidrolaz) ve β-1,4-D-glukozidazlar. Bu enzimlerden ilk ikisi selülozu oligosakkaritlere ve sellobiyoza parçalarken, β-glukozidaz sellobiyozu glukoza indirger (Shimada ve ark., 1994). Selülaz sisteminin bir parçası olan 1,4-β-D-

* Yüksek Lisans Tezi-MSc Thesis

glukan 4-glukanohidrolaz [EC 3.2.1.4] karboksimetil selülaz (CMCaz) veya *endo*-selülaz olarak da isimlendirilmektedir (Yoshigi ve ark., 1990). Selülazlar gıda endüstrisinde tohumlardan yağ ve meyve suyu ekstraksiyonunda, meyve sularının berraklaştırılmasında, tahılların homojen biçimde su çekmesini sağlama ve yeterince ıslanmasının artırılmasında, soya sosu gibi fermente soya gıdaların üretiminde ve soyanın dış zarının uzaklaştırılmasında, tekstil endüstrisinde fazla boyanın uzaklaştırılmasında, yıkama sonunda pamuk kumaşlardan çıkan mikrofibrillerin giderilmesinde, pamuk ya da pamuklu kumaşların yıkanması, renk parlaklığının artırılması ve yumuşaklığının geri kazandırılmasında kullanıldığı gibi, hayvancılıkta ruminant ve monogastrik hayvanların yemlerinde sindirilebilirliği artırmak amacıyla da kullanılmaktadır (Bhat ve Bhat, 1997).

Selülolitik enzimler daha önce bazı mikroorganizmalardan saflaştırılmış ve enzimatik özellikleri araştırılmıştır. *Bacillus* türleri selülazın (β-1,4-glukanaz) da dahil olduğu pek çok ekstraselülar enzim üretmektedir (Priest, 1977; Koide ve ark., 1986). Termofilik *Bacillus* sp.'lerce üretilen selülazlar daha önce rapor edilmiştir (Mawadza ve ark., 2000).

Bu çalışmamızda termostabil bir CMCaz üreten *Bacillus* suşu (*Bacillus* sp. YET-1) izole edilerek, enzimin kısmi karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve Metot

Materyal

Bakteri ve besiyeri

Bu çalışmada kullanılan termofil *Bacillus* sp. YET-1 suşu Adana'da yerelması yetiştirilen toprak örneklerinden izole edilmiştir. Bu amaçla ekstrem koşullarda toprak örneklerinden pastörizasyon yöntemi ile *Bacillus* sp. izolasyonu yapılmıştır (Lennete ve ark., 1985).

Bakteriler %10 v/v gliserol içeren sıvı LB besi ortamında (%1 w/v bacto tryptone, %1 w/v NaCl, %0.5 w/v yeast extract, pH 7.5) -20 ˚C'de muhafaza edilmişlerdir. Bakteriler LB sıvı besiyerinde 55 ºC'de aerobik şartlarda üretilmişlerdir. Katı besiyeri olarak LB-Agar (%1.5 w/v agar) kullanılmıştır. CMCaz plak testi için LB-Agar'a %0.1 w/v CMC ilave edilmiştir.

Metot

Bakterilerin İzolasyonu

Termofil *Bacillus sp*. izolasyonu için yerelması yetiştirilen topraklardan örnekler alınmıştır ve bu örneklerden 1'er gr tartılıp 5 ml steril distile su ile karıştırıldıktan sonra süspansiyon haline getirilmiştir. Numuneler 80 ºC'de 10 dakika inkübe edilerek vejetatif hücrelerin ölmesi sağlanmıştır (Lennete ve ark., 1985). Isı şoku uygulamasından sonra LB sıvı besiyerine bu süspansiyondan bir miktar ekilerek 1 gece 55 ºC'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün tek koloni oluşumunu sağlayabilmek için üreme gözlenen bakteriler kültüründen seri sulandırmalar

yapılarak, LB agar besiyerine yayma şeklinde ekim yapılmış ve 55 ºC'lik etüve konularak tekrar 1 gece süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerinde tek düşmüş farklı morfolojik görünüme sahip 60 koloni seçilmiş ve LB agar besiyerine steril kürdan ile ekimi yapılmıştır.

Plak testleri

Seçilen izolatlar, CMCaz aktivitesinin varlığını belirlemek için LB-CMC-Agar besiyerine (%0.1 w/v CMC) ekilmiştir. 55 ºC'de 1 gece inkübasyondan sonra bakteri plağına, yüzeyi kaplayacak miktarda %0.2 w/v Kongo kırmızısı boyası dökülmüştür. 15 dakika sonra boya uzaklaştırılarak plağın üzerine bu sefer 1 M NaCl solüsyonu ilave edilmiş ve 15 dakika daha beklenerek fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Plaklarda kırmızıya boyanan zeminde sarımtrak halka oluşturan koloniler CMCaz pozitif kolonilerdir (Teather ve Wood, 1982).

Enzimatik analizler

Bacillus sp. YET-1 izolatı LB (pH: 7,5) sıvı besiyerinde 55 °C'de 1 gece (250 devir/dakika) çalkalayıcıda üretilmiştir. Daha sonra bakteri kültürü 4950 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek çöktürülmüş ve hücre dışı kültür sıvısı (süpernatant) elde edilmiştir. 1 ml süpernatantın aksi belirtilmedikçe 1 ml substrat (%2 w/v CMC, 50 mM Na-fosfat, pH 6.5) ile 55°C'de 30 dakika inkübasyonu sonucunda indirgenen şekerlerin DNS metoduna göre tayini ile belirlenmiştir (Miller, 1951).

CMCaz enziminin optimum sıcaklığı, kültür süpernatantının substrat ile 40-100 °C arasındaki sıcaklıklarda 30 dakika inkübasyonu ile hesaplanmıştır. Sıcaklık direncinde substrat, daha önce 30-100 °C arasındaki sıcaklıklarda 15'er dakika ön denatürasyon işlemine tabi tutulmuş kültür süpernatantları ile optimum aktivite sıcaklığı değerinde 30 dakika reaksiyona sokularak hesaplanmıştır. pH optimumunun belirlenmesinde kültür süpernatantları 5'ten 12'ye kadar değişen pH değerlerine sahip tamponlar (Na-Asetat (pH 5.0-6.0), Na-Fosfat (pH 6.0-7.0), Tris (pH 8.0-12.0)) kullanılarak hazırlanmış substratlar ile reaksiyona sokularak hesaplanmıştır (Özcan, 1992).

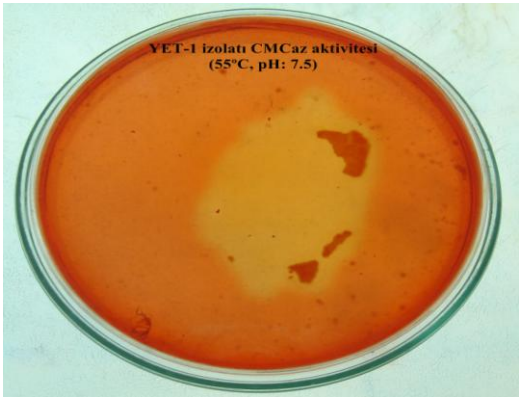
Sıcaklık optimumu, sıcaklık direnci ve pH optimumu deneylerinde reaksiyonlar 3 ml DNS eklenerek sonlandırılmış ve 5 dakika kaynatılmıştır. Soğutulan örnekler 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülerek değerlendirilmiştir.

SDS-PAGE ve zimogram analizi

Enzimlerin toplam protein analizi SDS-PAGE kullanılarak Laemmli, (1970)'e göre yapılmıştır. CMCaz enziminin zimogram analizinde ise SDS-CMC-PAGE (%2 w/v CMC) kullanılarak Saul ve ark., (1990)'a göre gerçekleştirilmiştir.

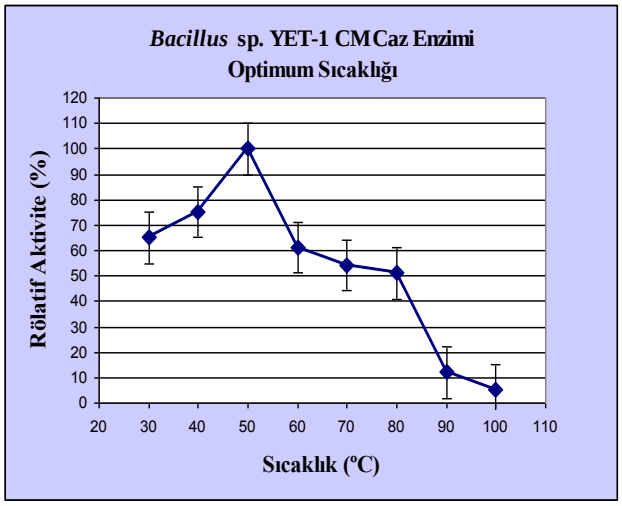
Araştırma Bulguları ve Tartışma

Adana'da yer elması yetiştirilen topraklardan alınan örneklerden *Bacillus* sp. YET-1 suşu izole edilmiş ve LB besiyerinde 55 °C'de üretilmiştir. Bu sonuç *Bacillus* sp. YET-1 suşunun normal düzeyde termofil olduğunu göstermektedir. LB-CMC-Agar plağının Kongo kırmızısı ile boyanması sonucu *Bacillus* sp. YET-1'in CMCaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *Bacillus* sp. YET-1 suşunun CMCaz aktivitesinin LB-CMC-Agar'da gösterilmesi

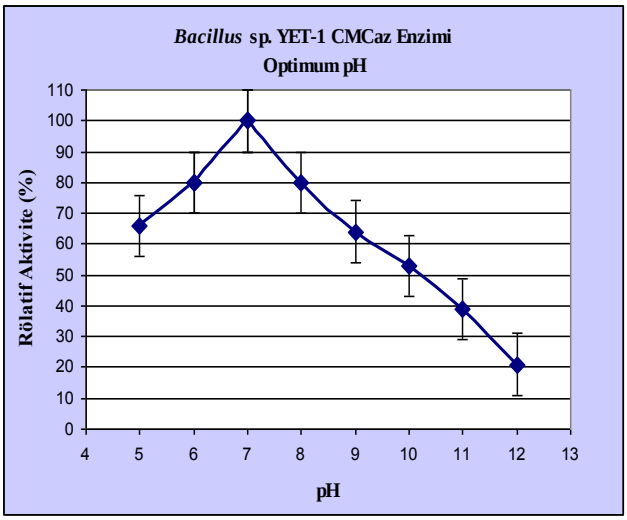
Yapılan enzimatik analizler sonucunda CMCaz enziminin sıcaklık optimumu 50 °C belirlenmiştir.



Şekil 2. *Bacillus* sp. YET-1 suşuna ait CMCaz enziminin sıcaklık optimum grafiği

Bununla birlikte enzimin inkübasyon sıcaklığı 80 °C'ye yükseltildiği zaman enzim aktivitesi % 51 düzeyine düşmüştür. Robson ve Chambliss (1984), *Bacillus* sp. izolatından elde ettikleri CMCaz enziminin 58 °C'de maksimum aktivitesini gösterdiğini bildirmişlerdir. Lin ve ark. (1998), *Bacillus sp*. TS-23 suşunda enzim üretme yeteneğinin 42-60 °C aralığında gerçekleştiğini, en yüksek düzeyde enzim üretiminin ise 55 °C'de meydana geldiğini bildirmişlerdir. Mawadza ve ark. (2000), izolasyonunu yaptıkları *Bacillus* sp. CH43 suşu için optimum sıcaklık değerini 70 °C ve *Bacillus* sp.HR68 için ise 65 °C olduğunu belirlemişlerdir. Oyekola ve ark. (2007), izolasyonunu yaptıkları endoglukanaz enziminin sıcaklık optimumunun ise 50 °C olduğunu bildirmişlerdir. Aygan (2008), *Bacillus* sp. C-14 suşundan izole ettiği endoglukanaz enziminin optimum aktivite sıcaklığının ise 50 °C olduğunu bildirmiştir. Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, *Bacillus* sp. YET-1 CMCaz enziminin normal düzeyde termostabil özellik gösterdiği görülmektedir.

Bacillus sp. YET-1 CMCaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 7.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 3).

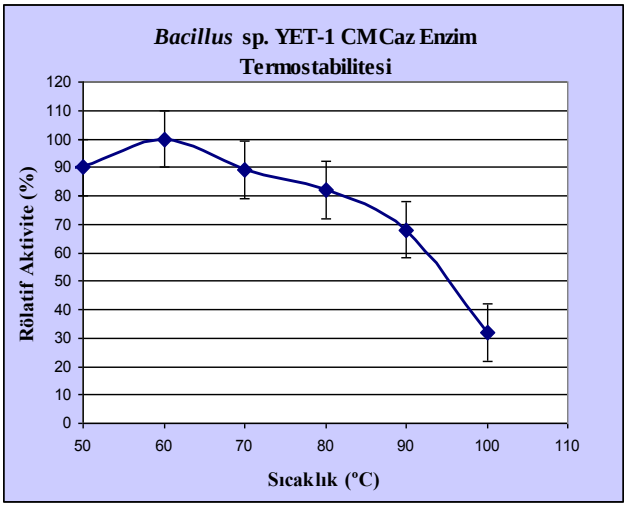


Şekil 3. *Bacillus* sp. YET-1 suşuna ait CMCaz enziminin pH optimum grafiği

Enzim pH 6.0-7.0 aralığında ortalama % 90 aktiviteye sahiptir. Robson ve Chambliss (1984), Hreggvidsson ve ark. (1996), Mawadza ve ark (2000), Saha (2002), Li ve ark. (2006), Voget ve ark. (2006), izolasyonunu gerçekleştirdikleri selülaz (CMCaz) enzimlerinin optimum pH 4.0 ve 7.0 aralığında aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir. Zvereva ve ark. (2006), haloalkaofil anaerob bakteriden optimum pH 6.0-9.0 arasında aktivite gösteren selülaz enzimi izole etmişlerdir. Li ve ark. (2006), *Bacillus* sp. AC-1 bakterisinden izole edilen termoasidofilik endoglukanaz enziminin optimum aktivitesini pH 4.5-6.5 aralığında gösterdiğini bildirmişlerdir. Literatür verilerinde şu ana kadar *Bacilus* sp.

suşlarından izole edilen selülaz (CMCaz) enzimleri dikkate alındığında *Bacillus* sp. YET-1 CMCaz enziminin nötral pH değerine sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanında YET-1 CMCaz enziminin pH 6.0-7.0 arasında % 90 aktiviteye sahip olması asidik karaktere daha yakın durduğunu görülmektedir.

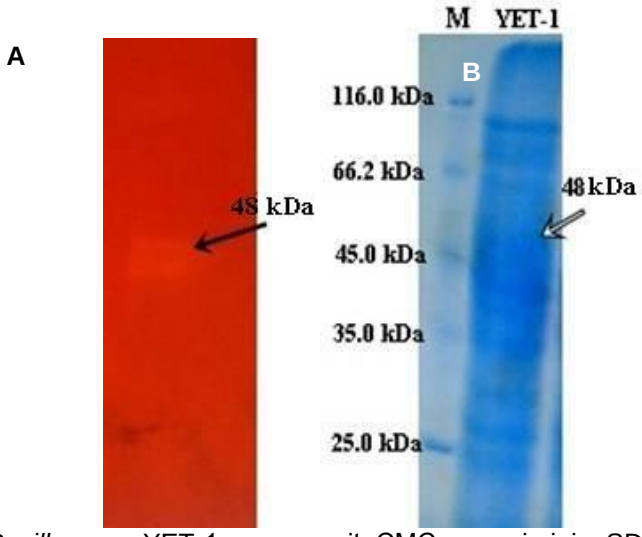
Bacillus sp. YET-1 CMCaz enziminin 90 ºC 15 dakikalık ön inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini ortalama % 70 oranında koruduğu saptanmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. *Bacillus* sp. YET-1 suşuna ait CMCaz enziminin termal kararlılık grafiği

Hreggvidsson ve ark. (1996), izole ettikleri termofilik CMCaz enziminin 100 °C'de 3.5 saat inkübasyon ile orijinal aktivitesini %50 korurken, 90°C'de 16 saat inkübe edildiğinde %80 koruduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcılar enzimi yüksek düzeyde termostabil olarak tanımlamışlardır. Hakamada ve ark. (1997), *Bacillus* sp. KSM-S237'den izole ettikleri endoglukanaz enziminin 10 dakikalık inkübasyon sonunda orijinal aktivitesini 20 ºC'de tamamen koruduğunu, 40 ºC'de aktivitenin % 90'a, 50 ºC'de % 50'ye 100 ºC'de ise %30'a düştüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışmada bulunan sonuçlar *Bacillus* sp. YET-1 CMCaz enziminin, 90 ºC'ye kadar ısısal işlemlerin kullanıldığı uygulamalarda 15 dakika süreyle en az %70 randımanla kullanılabileceğini göstermektedir.

Zimogram analizi, izole edilen termofilik *Bacillus* sp. YET-1 CMCaz enziminin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 48 kDa olduğunu göstermektedir (Şekil 5).



Şekil 5. *Bacillus* sp. YET-1 suşuna ait CMCaz enziminin SDS-PAGE'de toplam protein (A) ve SDS-CMC-PAGE'de zimogram (B) analizleri

Literatürlerde selülaz (CMCaz) enzimlerinin büyük çoğunluğunda moleküler ağırlıkların 35 ve 85 kDa arasında değiştiği bildirilmiştir (Han ve ark, 1995; Mawadza ve ark.,2000; Hakamada ve ark., 2002; Singh ve ark., 2001; Endo ve ark., 2001; Kim ve ark., 2005; Voget ve ark., 2006; Zvereva ve ark, 2006; Zhang ve ark., 1983; Li ve ark, 2006).

Sonuç

Selülaz kullanımı günümüze kadar özellikle tekstil, temizlik, içecek ve şarap endüstrisinde önemli düzeyde artış göstermiştir. Ayrıca hayvan yemlerinin üretimi, tekstil ve temizlik endüstrisi, kağıt hamuru hazırlama işletmeleri ile tarımsal uygulamalar endoglukanazların kullanım alanları arasındadır. Günümüzde selülaz (CMCaz) enziminin dünya enzim ticaretindeki yeri yaklaşık % 20 düzeyindedir. İzolasyonunu gerçekleştirdiğimiz *Bacillus* sp. YET-1 CMCaz enziminin optimum aktivite sıcaklığının 50 ºC'de ve 50-90 ºC aralığında en az % 70 termostabil olması, peletlenmiş hayvan yemi üretimi gibi uygulamalarda kullanılacak özellikte olduğunu göstermektedir. Son yıllarda özellikle selülozdan biyoetanol üretimi, üzerinde en çok çalışılan konular arasında yer almaktadır. Selülozun tamamen oligosakkaritlere dönüşümünün sağlanmasında endoglukanaz ve ksilanaz enzimleri birlikte kullanılması başarı oranının üst düzeylere taşıyabileceği belirtilmektedir. Bu alanın giderek önem kazanması, selülozu kısa sürede hidrolize edecek enzimlere olan ihtiyacı giderek arttırmaktadır. *Bacillus* sp. YET-1 suşunun sadece CMCaz enzimi üretmesi (proteaz, ksilanaz ve amilaz v.b. enzimlerinin bulunmaması) bu enzimin herhangi bir saflaştırma işlemine tabi olmadan doğrudan üretilebileceğini mümkün kılmaktadır.

Kaynaklar

AYGAN, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp*.* İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Ç.Ü. F. B. E. Doktora Tezi.

BHAT, M.K., BHAT, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnology Advances, 15: 583-620.

BHAT, M.,K., 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. Biotechnolgy Advances, 18(5): 355-383.

ENDO, K., HAKAMADA, Y., TAKIZAWA, S. and KUBOTA, H., 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.

HAKAMADA, Y., ENDO, K., TAKIZAWA, S., KOBAYASHI, T., SHIRAI, T., YAMANE, T. and ITO, S., 2002. Enzymatic properties, crystallization and deduced aminoacid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. Biochimica et Biophysica Acta,1570: 174-180.

HAKAMADA, Y., KOIKE, K., YOSHIMATSU, T., MORI, H., KOBAYASHI, T. and ITO, S., 1997. Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus sp*. KSM-S237. Extremophiles, 1:151-156.

HAN, S.J., YOO, Y.J. and KANG, H.S., 1995. Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene. J.Biol. Chem. 270:26012-26019.

HREGGVIDSSON, G.O., KAISTE, E., HOLST, O., EGGERTSSON, G., PALSDOTTIR, A. and KRISTJANSSON, J.K., 1996. An Extremely Thermostable Cellulase from the Thermophilic Eubacterium *Rhodothermus marinus.* Appl. Environ. Microbiol.,62: 3047-3049.

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. Biotechnol. Lett., 27:313-316.

KOIDE, Y., NAKAMURA, A., UOZUMI, T., BEPPU, T., 1986. Molecular cloning of a celulase gene from *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. Agric. Biol. Chem., 50(1): 233-237.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

LENNETE, E.H., BALLOWS, A., HAUSLER, J.W.Jr. and SHADOMY, J.H., 1985. Manuel of Clinical Microbiology. Vol 4.USA.1149s.

LI, L., TIAN, H., CHENG, Y., JIANG, Z. and YANG, Z., 2006. Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces themophila.* Enzyme. Microbiol. Technol., 38: 780-787.

LIN, L.L., CHYAU, C.C. and HSU, W.H., 1998. Production ad properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23. Biotechno. Appl. Biohem. 28:61-68.

MAWADZA, C., HATTI-KAUL, R., ZVAUYA, R. and MATTIASON, B., 2000. Purification and characterization of cellulases produced by *Bacillus* Strain. J. Biotechnol., 83: 177-187.

MILLER, G.L., 1951. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 426-428.

OYEKOLA, O.O., NGESI, N., and WHITELEY, C.G. 2007. Isolation, purification and characterisation of an endogluanase and β-glucosidase from an anaerobic sulphidogenic bioreactor. Enzyme and Microbial Technology. 40: 637-644.

OZCAN, N., 1992. Cloning and Sequencing of a Cellulose Gene from *Fibrobacter succinoogenes* SD35, PhD Thesis, University of Aberdeen, U.K.

PRIEST, F.G., 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. Bacteriology Rev. 4183: 711-753.

ROBSON, L., M. and CHAMBLISS, G.H., 1984. Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. Appl. Environ. Microbiol., 47:1039-1046.

SAHA, B.C., 2002. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum.* Process Biochem., 37: 1279-1284.

SAUL, D.J., WILLIAMS, L.C., GRAYLING, R.A., CHAMLEY, L.W., LOVE, D.R. and BERGQUIST, P.L., 1990. celB, a Gene Coding for a Bifunctional Cellulase from the Extreme Thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*". Appl.Environ.Microbiol., 56: 3117-3124.

SHIMADA, K., KARITA, S., SAKKA, K., OHMIYA, K., 1994. Cellulases, xylanases, and their genes from bacteria. Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Application (Ed. by Y. Murooka and T. Imanaka). pp. 395. Marcel Dekker, Inc. New York.

SINGH, J., BATRA, N. and SOBTI, R.C., 2001. A highly thermostable, alkaline CMCase produced by a newly isolated *Bacillus sp*.VG1. World J. Microbiol. Biotechnol., 17: 761-765.

TEATHER, R.M., and WOOD, P.J., 1982. Use of Congo Red Polysaccaride Interactıons in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria From the Bovine Rumen. Appl. Environ. Microbiol., 43: 777-780.

WYNNE, E.C., PEMBERTON, J.M., 1986. Cloning of a gene cluster from *Cellvibrio mixtus* which codes for cellulase, chitinase, amylase, and pectinase. Applied and Environmental Microbiology, 52(6): 1362-1367.

VOGET, S., STEELE, H.L. and STREIT, W.R., 2006. Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. J Biotechnol 126:26-36.

YOSHIGI, N., TANIGUCHI, H., SASAKI, T., 1990. Cloning and sequencing of the *endo*-cellulase cDNA from Robillarda sp. Y-20. J. Biochem., 108: 388-392.

ZHANG, Q., TSUKAGOSHI, N., MIYASHIRO, S. and UDAKA, S., 1983. Increased production of α-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in thepresence of glycine. Applied and Environmental Microbiology,46: 293-295.

ZVEREVA, E. A., FEDOROVA, T. V., KEVBRIN, V. V., ZHILINA, T. N. and RABINOVICH, M. L., 2006. Cellulase activity of a haloalkaliphilic anaerobic bacterium, strain Z-7026. Extremophiles, 10: 53-60.