

ÖZET

α -Amilaz (EC 3.2.1.1 α -D-glukan-glukanhidrolaz), nişasta molekülündeki α -1,4 glikozidik bağlarının rastgele hidrolizini kataliz ederek glukoz, dekstrin ve limit dekstrinleri oluşturan bir enzimdir. α -Amilazlar başta gıda olmak üzere, tekstil, deterjan ve kağıt endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu uygulamalarda nişasta hidrolizinin gerçekleştirilmesi genellikle yüksek sıcaklıkta kararlı enzimlerin kullanılmasını gerektirdiğinden, uç sıcaklık koşullarında yaşayan mikroorganizmalar ve onların ürettiği enzimlere olan ilgi artmaktadır. *Bacillus* soyları gerek uç koşullarda yaşayabilme gerekse hücre dışına enzim salgılayabilme özelliklerinden dolayı α -amilaz enziminin üretiminde sıklıkla kullanılan mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. GYTE Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Enzim Moleküler Genetiği Grubu ve Kızılay Pendik Tıp Merkezi Bakteriyoloji Laboratuvarı'nın işbirliği ile yürütülen bu tez çalışmasında, α -amilaz üreticisi *Bacillus* soylarının yerel ekosistemlerden izole edilmesi, nitelendirilmesi ve enzim optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, yerel kaynaklardan alınan örneklerden primer izolasyonu takiben, morfolojik ve mikroskopik olarak *Bacillus* cinsi üyesi olduğu düşünülen soyların α -amilaz üretkenlikleri nişasta-agarda test edilmiştir. Üretken soylar nişasta-agarda verdikleri halo çaplarına göre seçilerek manuel tanımlama testlerine alınmıştır. Tanımlama sonucu soyların benzeştiği tür isimleri belirlenmiş ve bu soylardan bazıları ile enzim aktivite çalışmaları yapılmıştır. Aktivite çalışmalarına alınan soylar ayrıca yarı otomatik ve tam otomatik tanımlama kitleri ile de isimlendirilmeye çalışılmıştır. Anılan tanımlama yöntemleri ile tür adı verilemeyen soylardan birisinin moleküler tiplendirme çalışmalarına alınması kararlaştırılmış, ilgili soyun genomik DNA' sı izole edilmiştir. 16S rDNA PCR ile çoğaltılmış ve dizi analizi çalışmaları yapılmıştır.

Aynı soyun kültür ortamına salgıladığı α -amilazın ön nitelendirme çalışmaları yapılmış ve nişastanın bu enzim ile hidrolizi sonucu oluşan ürünler ince tabaka kromatografisi ile irdelenmiştir.

SUMMARY

α -amylase (E.C. 3.2.1.1 α -glucan-glucan hydrolase) is an enzyme which catalyses the hydrolysis of the α -1,4 glycosidic linkages of starch in a random manner, produces mainly glucose, dextrans and limit dextrans. These enzymes have been widely used especially food, textile, detergent and paper industries. Since, starch based processes in these applications require thermostable enzymes, the microorganisms living in extreme conditions and their enzymes are more favorable for researchers. *Bacillus* strains have been widely used as a source of these enzyme, due to their ability of surviving in extreme habitats and secretion of extracellular enzymes. In this thesis work performed with collaboration of Enzyme Molecular Genetics Group, Department of Biology, Gebze Institute of Technology and Bacteriology Laboratory, Pendik Medical Centre, Kızılay, isolation and identification of the α -amylase producing *Bacillus* strains from local areas and the optimization of the enzyme production have been aimed. In this respect, following the primary isolation, *Bacillus* strains were screened on starch-agar plates for their alpha amylase production capability. Among these strains, 35 isolates showing broader zone of clearance around individual colonies were chosen for the manual identification tests. The closest species name(s) for each of 35 *Bacillus* isolates has been determined according to the morphological and biochemical properties of *Bacillus* genus defined in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Of the 35 pre-identified isolates, nine representing better enzyme production in the liquid culture conditions were taken into the enzymatic activity experiments to optimize the enzyme production. These nine isolates were further identified by using API 50 CHB/E kit and VITEK system. One of these strains which was unidentified with afore mentioned techniques, was selected for the molecular identification analysis and its genomic DNA was isolated. The 16S rDNA was amplified by PCR and then used for the DNA sequence analysis.

Moreover, preliminary characterization studies of the α -amylase secreted into the culture medium by the same strain were achieved in order to determine biochemical properties of the enzyme and the reaction products of the starch hydrolysis by this enzyme have been evaluated by using thin layer chromatography.

TEŞEKKÜRLER

Öncelikle bu tez projesini planlayan ve çalışmalarım boyunca değerli fikirleri ile yol gösteren, desteğini, emeğini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Prof. Dr. Füsün GÜMÜŞEL' e, laboratuvar çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu anlayış, sabır, yardım ve vermiş olduğu tüm emek ve özveriden dolayı Yrd. Doç. Dr. Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK' e, bakteriyel tanımlama çalışmaları boyunca bizlerle birlikte olarak yol gösteren, beraber çalıştığımız sürece bana laboratuvarda çalışmanın önemini ve sistemini öğreten Kızılay Pendik Tıp Merkezi Bakteriyoloji Laboratuvarı Şefi Uzman Mikrobiyolog Seza ARTUNKAL' a ve bizlerden yardımlarını esirgemeyen laboratuvar çalışanları Biyolog Nihan NUHOĞLU, Melike BEKAROĞLU, Saime ŞAHİN ve Makbule BIÇAK' a, tez çalışmalarımızı birlikte yürüttüğümüz ve her zaman yardımını aldığım arkadaşlarım Hüseyin BALCI ve Mutlu BATTAL' a, laboratuvar aşamasında bizlere destek veren Ar.Gör. Yosun MATER' e, Api ve VITEK sistemlerinde bizlerle birlikte olan Biyolog Mehmet BAYSAL' a ve her zaman yanımda olan SEVGİLİ AİLEM ve Şevket Gökhan ÖZTÜRK' e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜRLER	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>BACILLUS</i> CİNSİ	1
1.1.1. Morfolojik özellikler	1
1.1.2. Fizyolojik özellikler	4
1.1.3. Habitat	7
1.1.4. Taksonomi	9
1.1.5. <i>Bacillus</i> Cinsinin Biyoteknolojideki Yeri	11
1.2. α -AMİLAZ ENZİMİ	14
1.2.1. Amilazın mikroorganizmalar arasında dağılımı	15
1.2.2. α -Amilaz aktivitesinin belirlenmesi	15
1.2.3. α -Amilazın biyokimyasal özellikleri	16
1.3. α -Amilazların endüstriyel uygulamaları	18
1.3.1. Ekmek ve fırıncılık endüstrisinde kullanımı	18
1.3.2. Nişasta sıvılaşması ve şekerleşmesi	19
1.3.3. Tekstil endüstrisi	19
1.3.4. Kağıt endüstrisi	19
1.3.5. Deterjan endüstrisi	20
1.4. Tezin Amacı	21
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
2.1. Gereçler	22
2.1.1. Kullanılan Sarf Malzemesi	22
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	24
2.2. Yöntem	26

2.2.1. Örneklerin toplanması	26
2.2.2. Primer İzolasyon	26
2.2.2.1. Primer İzolasyonun Yapıldığı Besi Yerleri	27
2.2.2.2. Primer İzolasyon Yöntemleri	28
2.2.3. α -Amilaz üreticisi soylarını seçimi	29
2.2.3.1. Kullanılan besi yeri	29
2.2.3.2. Yöntem	29
2.2.4. α -Amilaz üreticisi olarak seçilen <i>Bacillus</i> soylarının tanımlanması	30
2.2.4.1. Manuel olarak yapılan tanımlama testleri	30
2.2.4.2. Yarı otomatik ve tam otomatik tanımlama sistemleri	41
2.2.5. Bakterilerin uzun süreli stok kültürlerinin hazırlanması	41
2.2.6. α -Amilaz Aktivite Testi	42
2.2.7. Yerel soylarda α -amilaz aktivitesinin belirlenmesi	43
2.2.8. % 1 Nişasta içeren M-9 besi yerinde α -amilaz aktivitesinin belirlenmesi	44
2.2.9. % 1 Nişasta içeren M-9 besi yerinde gerçekleştirilen erlen çalışması	44
2.2.10. % 1 Nişasta içeren alkali M-9 besi yerinde (pH 9.3) gerçekleştirilen erlen çalışması	44
2.2.11. Kültür üst sıvısı ile gerçekleştirilen enzim ön nitelendirme çalışmaları	45
2.2.12. SDS-PAGE ve zimogram analizi	46
2.2.12.1. SDS-PAGE için örneklerin hazırlanması	46
2.2.12.2. SDS-PAGE’de kullanılan jellerin hazırlanması ve örneklerin yüklenmesi	47
2.2.12.3. Zimogram analizi için örneklerin hazırlanması	48
2.2.12.4. Zimogram analizinde kullanılan jeller ve örneklerin yüklenmesi	49
2.2.13. Moleküler tiplendirme çalışmaları	49
2.2.13.1. Genomik DNA İzolasyonu	49
2.2.13.2. 16S rRNA genlerinin PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltılması	52
2.2.13.3. A28 soyunun 16S rDNA dizi analizi çalışmaları	55
2.2.14. A28 soyu kültür üst sıvısı ile yapılan ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography, TLC)	58
3. BULGULAR	60

3.1. Primer İzolasyon Sonucu Elde Edilen Soylar ve α -Amilaz Üreticilerinin Tanımlanması	60
3.2. α -Amilaz Üreticisi Soylarda Hücre Büyümesi ve Enzimatik Aktivite	64
3.3. Kültür üst sıvısı ile gerçekleştirilen enzim ön nitelendirme çalışmaları	70
3.4. SDS-PAGE ve zimogram analizleri	71
3.5. A28 soyu 16S rDNA'sının PCR ile çoğaltımı	72
3.6. 16S rDNA dizi analizi çalışmaları	73
3.7. A28 soyu kültür üst sıvısı ile yapılan ince tabaka kromatografisi	74
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	76
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	90

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
g	Gram
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaCl	Sodyum Klorür
HCl	Hidro Klorik Asit
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
KH ₂ PO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
NaNO ₃	Sodyum Nitrat
KCl	Potasyum Klorür
FeSO ₄	Demir Sülfat
K ₂ HPO ₄	Potasyum Hidrojen Fosfat
CuCl ₂	Bakır Klorür
MnSO ₄	Mangan Sülfat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
U.V	Ultra Viyole
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Derece Santigrat
ml	Mililitre
U	Ünite
L.B	Luria Broth
M	Molar
mM	Milimolar
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGDA	Etilen Glikol Diasetat
BSA	Bovine serum albumine
U	Ünite
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromide
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TLC	Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)

TEMED	N, N, N', N'- Tetrametilenetilendiamin
TCA	Trikloro asetik asit
Kb	Kilo baz
APS	Amonyum persülfat
kDa	Kilo Dalton

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Bacillus</i> hücrelerinin Gram boyama sonrası mikroskopta görünümü	1
3.1. α -amilaz üreticisi soyların starch-agarda lugol uygulaması sonrası verdikleri şeffaf zonların görünümü	60
3.2. A3 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi	64
3.3. A7 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi	65
3.4. A18 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi	65
3.5. A23 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi	66
3.6. A26 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi	66
3.7. A28 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi	67
3.8. P19 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi	67
3.9. A4 soyunun alkali M-9 besi yerinde hücre büyümesi ve enzim aktivitesi	68
3.10. A4 soyunun M-9 (pH 6,7) besi yerinde hücre büyümesi ve enzim aktivitesi	68
3.11. P22 soyunun M-9 (pH6.7) besi yerinde hücre büyümesi ve enzim aktivitesi.	69
3.12. P22 soyunun alkali M-9 besi yerinde hücre büyümesi ve enzim aktivitesi	69
3.13. Sıcaklığın α -amilaz aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi	70
3.14. pH'nın α -amilaz aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi	71
3.15. Nişasta zimogram analizi ve kültür üst sıvısı SDS-PAGE analizi	72
3.16. A28 soyunun genomik DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı 1. ve 2. PCR ürünlerinin % 1 agaroz jelde görünümü	73
3.17. M13 bakteriyofajı tek iplikli DNA'sının dizi analizi otoradyogramı	74
3.18. Nişastanın A28 soyu alfa amilazı (kültür üst sıvısı) ile hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin TLC profili.	75

TABLOLAR DİZİNİ

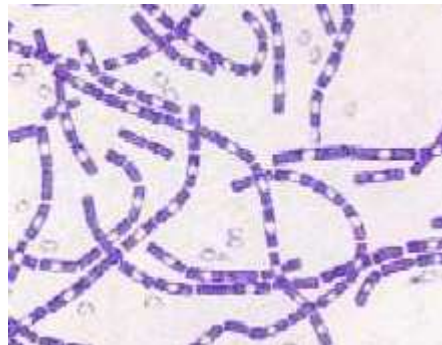
<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Bacillus</i> soylarının izole edilebileceği habitatlar	8
1.2. 16S rRNA analizlerine göre <i>Bacillus</i> türlerinin gruplandırılması	11
1.3. Bazı <i>Bacillus</i> türlerinden elde edilen α -amilaz'ların özellikleri	13
2.1. Toprak ve su örneklerinin yeri ve özellikleri	26
2.2. Maltoz kalibrasyon eğrisi değerleri	43
3.1. Seçilen soyların kaynakları, izolasyon koşulları, α -amilaz üretkenlikleri ve benzeştikleri tür isimleri	61
3.2. α -amilaz üreticisi soyların manüel testler, API kitleri ve VITEK sistemiyle yapılan tanımlama sonuçlarına göre benzeştikleri tür(lerin) adları	63

1. GİRİŞ

1.1. *BACILLUS* CİNSİ

1.1.1. Morfolojik özellikler

Bacillus cinsi bakteriler, çomak şekilli, Gram (+) ya da özellikle yaşlı kültürlerde Gram (-) olabilen mikroorganizmalardır. *Bacillus* türleri aerobik ya da fakültatif anaerobik olabilirler. Bu cinsin en önemli özelliği, bakteri hücresinin içinde yuvarlak, oval ya da silindirik şekilde olan ve ışığı kırabilen "endospor" ların oluşturulmasıdır. Vejetatif hücreler düz, yuvarlak ya da köşeli uçları olan çomaklar şeklindedir ve çomaklar 0.5 x 1,2 µm gibi küçük boyutlarda veya 2.5x 10 µm kadar büyük olabilmektedir (Sneath, 1986; Turnball and Kramer, 1995). *Bacillus* cinsinde hücreler tek tek, ikili çomak halinde, kısa veya uzun zincir şeklinde dizili olabilir (Slepecky ve Hemphill, 1992).



Şekil1.1. *Bacillus* hücrelerinin Gram boyama sonrası mikroskopta görünümü.

Bacillus türlerinin hücre zarları, Gram (+) hücreler için tipik bir örnek oluşturduklarından ve bakterinin sporulasyon ve germinasyonundaki rollerinin yanı sıra sıcakseverliği ile de ilintili olduklarından çok fazla çalışılmıştır. Örneğin sıcaksever bir bakteri olan *B. stearothermophilus*'un yüksek sıcaklıkta büyüme yeteneğinin zarın lipid bileşimindeki değişikliğe bağlı olduğu açıklanmıştır. *Bacillus* hücre zarlarında yer alan lipidlerin tipi ve dağılımının yanı sıra yağ asitleri de büyük bir çeşitlilik göstermektedir (Slepecky ve Hemphill, 1992).

Birkaç *Bacillus* türü kapsül içerir. *B. anthracis*'in hastalık yapma özelliğinde etken olan kapsül oluşumu ayrıntılı şekilde çalışılmıştır. *B. subtilis*, *B. megaterium* ve *B. licheniformis* gibi bazı türler D- ya da L-glutamik asit homopolipeptitleri içeren kapsüllere sahiptir. *B. circulans*, *B. mycoides* ve *B. pumilus* gibi bazı türler

karbohidrat kapsüller üretirler (Slepecky and Hemphill, 1992).

Endospor formu, yapı ve bileşim olarak diğer bakteriyel-dinlenme formlarından oldukça farklıdır. Nukleus ve protoplast, sıcaklığa dirençli DNA, RNA, ribozomlar, enzim ve diğer proteinleri içerir ve bu yapılar ilkel bir germ hücre duvarı ile çevrilmiştir. Daha dışta vejetatif hücre duvarına benzeyen bir peptidoglikan tabakadan oluşan korteks bulunur. Protoplast ve korteks en dıştan bir spor kılıfı ile çevrelenmiştir (Sneath, 1986).

Endospor formu ve spor oluşturan ana hücre (sporangium) *Bacillus* türlerinin karakteristik özelliğidir. Endosporlar genellikle silindirik eliptik, oval ya da yuvarlaktır, fakat bazı soylarda böbrek ya da muz şekilli endosporlara da rastlanmaktadır. Sporlar sporangium içinde santral, parasantral, subterminal ya da terminal konuşlanabilir. Endospor oluşumu sırasında ana hücre genellikle kendi şeklini korursa da bazı soylarda sporangium şişmeleri görülmektedir. 1973 yılında Gordon ve grubu çalıştıkları soyları, spor şekilleri ve sporangium morfolojisine bağlı olarak, bugün de yaygın olarak kullanıldığı üzere 3 morfolojik gruba ayırmıştır (Sneath, 1986; Turnball ve Kramer, 1995):

Morfolojik grup 1: Sporangiumda şişme görülmez. Sporlar elips ya da silindir şeklindedir ve sporangium içinde santral ya da terminal konuşlanırlar.

-alt grup A (büyük hücreli grup): Basillerin hücre çapı 1 µm'ye eşit ya da büyüktür.

-alt grup B (küçük hücreli grup): Hücre çapı 1 µm'den küçüktür.

Morfolojik grup 2: Sporangium eliptik şekilli, santral ve terminal sporlarla şişmiş durumdadır. Bu grupta Gram boyanma özelliği değişkendir.

Morfolojik grup 3: Sporangium küresel, subterminal ya da terminal sporlarla şişmiş durumdadır. Bu grupta da Gram boyanma özellikleri değişkendir (Sneath, 1986; Turnball ve Kramer, 1995)

Olgunlaşmış sporlar lizisin bir sonucu olarak sporangiumdan serbest bırakılırlar. Dolayısıyla mikroskopik incelemede aynı kültürde vejetatif hücreler, endospor bulunduran form ve sadece spor formu bir arada bulunabilir. Bazı türlerde küresel ve eliptik sporlar aynı kültürde görülebilir. Sporlar yaşam döngülerinin hangi evresinde bulunduklarına bağlı olarak oldukça refraktif (ışığı kıran)

görünebilir. Endosporlar, tek başına spor olarak ya da vejetatif hücre içindeki konumları ile faz-kontrast mikroskopu kullanılarak rahatlıkla tespit edilebilirler. Buna ek olarak, Gram boyama da sporların varlığının belirlenmesinde etkin olarak kullanılmakta, vejetatif hücreler ya da sporangiumun vejetatif kısmının boyayı almasına karşın, sporlar boya almadığı için ayırdettirici olmaktadır (Slepecky and Hemphill, 1992). Sporların şeklini ve sporangiumda bulundukları konumları incelemek için genellikle farklı yaşlardaki kültürler kullanılır. Sporların mikroskopik preparasyonları en iyi immersion yağı ile ya da 0.5 mm kalınlıkta % 2 su agarı ile örtülmüş hücrelerin üzerine lameller kapatılarak X1000 büyütmede incelenebilir (Sneath, 1986).

Bacillus soylarının koloni morfolojisi genellikle çevresel faktörlerle ilişkili olarak çok çeşitlilik gösterir. Besi yeri bileşimi, inkübasyon sıcaklığı, nem gibi kültür koşulları koloni özelliklerinin değişmesine neden olabilmektedir. Sadece küçük koloniler oluşturabilen soylar bir yana, koloni çapı büyük ölçüde petrideki besiyeri miktarına ve bulundurduğu besin konsantrasyonuna bağlıdır. *Bacillus* cinsinde belli bir türün farklı soyları karakteristik kabul edilebilecek, benzeri koloni yapıları gösterebildiği gibi, birçok türde değişik koloni varyasyonları gözlemlenebilir. Koloni morfolojisinde uç düzeydeki farklılıklar *B. subtilis* ve yakın türlerde görülür. Örneğin, *B. pumilus*'un 25 farklı S (smooth) ve R (rough) kolonisi olduğu görülmüştür. Ayrıca bu kolonilerin alt kültürlerinde diğer koloni tipine dönüşüm (R'den S'ye ya da S'den R'ye dönüşüm) görülebilir. Koloni farklılaşmasının besiyerinde bulunan pepton çeşitlerinden kaynaklanabildiği belirlenmiştir (Sneath, 1986).

En özgün koloni morfolojisi *Bacillus mycoides* soylarında görülür. Bu soylar 48 saat içinde “rhizoid” bir üreme ile petriyi tamamen kaplarlar. Rhizoid büyüme genellikle sola doğru dönme şeklindedir. Sadece birkaç soyun sağa doğru dönerek büyüdüğü görülmüştür. Rhizoid büyüme bazı türlerde besiyerinin pH'sı ile doğrudan ilişkilidir. Bu tür büyüme kendiliğinden kaybolabildiği gibi, çok miktarda nutrient besiyerinin çok küçük miktarda bakteri ile aşılandığı kültürlerde hiç görülmez (Sneath, 1986).

Bazı *Bacillus* türleri, özellikle ekimden önce iyi kurutulmamış petrilerde yayılma eğilimi gösterirler. Bunun yanında *B. alvei*, *B. circulans* ve *B. sphaericus*'un bazı soylarında hareketli koloniler normal koşullarda (kuru petriler

gibi) dahi görülebilir. Yürüyen ve dönen koloniler mikroskop altında X50 büyütmede gözlemlenebilir. Bu tür koloniler petri üzerinde saatte yaklaşık 15 mm hızla, çoğunlukla saat ibresinin tersi yönde, eğri ya da spiral şekilde yol alarak yürürler. Bunun sonucunda da petrilerin yüzeyi genellikle 24-48 saat içinde tamamen kaplanır (Sneath, 1986).

Bir petriye ekilen saf bir koloni bazen mat, yarı mat, bazen de beyaz veya krem renkli olabilir. Bu farklılıklar kolonilerdeki sporulasyon derecesi ile ilişkilidir. *Bacillus* türlerinin çoğu pigmentsizdir. Ancak bulundukları besi yerine bağlı olarak pigment oluşturan türler mevcuttur. Örneğin; *B. megaterium* soyları özellikle kazein agarda sarı bir pigment oluşturlar. Sarımsı pigment oluşumu ayrıca *B. fastidiosus*'un allantoin agarda uzun süreli inkübasyonu sonucu da gözlenir. Bunlardan başka *B. firmus*, *B. sphaericus*'un pembe, *B. pulvifaciens*'in kırmızı-turuncu, *B. subtilis*'in pembe, sarı, turuncu, kahverengi pigmentler oluşturabildiği gözlenmiştir. Ayrıca *B. cereus* ve *B. subtilis* türlerinin birkaç soyunun sarımsı yeşil, floresan pigment oluşturduğu da bilinmektedir *Bacillus* türleri bütün besi yerlerinde pigment üretmezler. Örneğin, *B. subtilis subsp. atterimus* sadece kullanabildiği karbohidratların bulunduğu besi yerinde koyu mavi bir pigment oluşturur (Sneath, 1986).

1.1.2. Fizyolojik özellikler

Bacillus cinsinde türler çok çeşitli fizyolojik yeteneklere sahiptirler. Psikrofilik (20 ile -20°C arasındaki sıcaklıklarda yaşayan), termofilik (55-80°C'ta yaşayan), asidofilik (düşük pH'larda yaşayan), alkalofilik (yüksek pH'larda yaşayan) ve halofilik (2-5 M NaCl'de yaşayan) türler mevcuttur (Beffa ve ark., 1996). *Bacillus* soyları genellikle katalaz pozitifler ve oksidaz pozitif veya negatif olabilmektedirler. Hareketlilik de bu cins içinde yaygın bir özellik olarak bilinmektedir (Turnball ve Kramer, 1995).

Bacillus cinsinde büyüme koşulları ve beslenme oldukça geniş bir çeşitlilik gösterir. Yine de soyların birçoğu nutrient agar besi yerinde büyüyebilir. Organizmaların besin gereksinimleri spor şekli ve sporangium şişmesiyle uyumludur ve buna göre gruplandırılabilirler:

Grup 1: Basit besin kaynaklarına ihtiyaç duyanlar.

Grup 2: Daha kompleks gereksinimleri olanlar.

Grup 3: Zor beğenenler.

Aşağıda bazı *Bacillus* soyları bilinen fizyolojik özelliklerine göre gruplandırılmıştır:

Sıcakseverler: *B. stearothermophilus*, *B. thermodenitrificans*, *B. caldotenax*

Sıcak ve asit severler: *B. coagulans*, *B. acidocalderius*

Soğukseverler: *B. psychrophilus*, *B. macquariensis*, *B. globisporus*, *B. insolitus*, *B. psychrosaccharolyticus*

Alkaliseverler: *B. alcalophilus*

Nitrojen bağlama yeteneği olanlar: *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. azotofixans*

Nitrata nitrite indirgeyenler: *B. azotoformans*, *B. licheniformis*

Siyanür kullanan: *B. pumilus*

Yüksek pH ve NH_4Cl ' de üreyen: *B. pasteurii*

Böcek patojenleri: *B. thuringiensis*, *B. larvae*, *B. popilliae*, *B. sphaericus*, *B. lentimorbus*

İnsan ve hayvan patojenleri: *B. anthracis*, *B. cereus* (Slepecky ve Hemphill, 1992).

Birçok bakterinin aksine *Bacillus* türleri, genellikle logaritmik büyüme fazının sonunda ya da vejetatif hücreler besin bakımından zengin bir ortamdan fakir bir besi yerine alındığında "resting cell" (uyku, dinlenme hücresi) oluştururlar. Hücre içinde oluşan sporlar (endosporlar) optik kırınım, ince yapı, kimyasal bileşim ve çeşitli kimyasallara ve fiziksel strese direnç yetenekleriyle, vejetatif hücrelerden farklıdır. Endosporların direnç derecesi büyük ölçüde bulundukları koşullara bağlıdır (Sneath, 1986).

Bacillus soyları her kültür koşulunda endospor oluşturmazlar. Özellikle sıvı besi yeri genel olarak spor oluşturmadıkları bir ortamdır. Soyların birçoğu 10-50 mg/l mangan tuzu eklenmiş agar besi yerinde endospor oluşturmazlar. Ancak bu özelliklerini başka besi yerlerine pasaj yapıldığında veya zamana bağlı olarak kaybedebilir ya da azaltabilirler. Bu durum "oligospori" olarak adlandırılır. Endospor oluşumunu etkileyen diğer faktörler:

-inkübasyon sıcaklığı

-besi yerinin pH' sı

-besi yerinin havalandırma derecesi

-minerallerin ve belli karbon ve nitrojen bileşiklerinin varlığı ve konsantrasyonudur (Sneath 1986).

Endosporlar, genel olarak, çevresel faktörlere vejetatif formlarından daha dayanıklıdır. Vejetatif hücrelerle karşılaştırıldığında sporlar sıcaklığa 10^5 kat, UV ve radyasyona 10^2 kat veya daha fazla bir dirençle dayanabilmektedir. Ayrıca antibiyotik ve kimyasallara karşı da daha dayanıklı oldukları bilinmektedir. Örneğin; sporlar çamaşır suyu gibi bir dezenfektana vejetatif hücreden 10^4 kat daha dayanıklıdır (Slepecky ve Hemphill, 1992).

Spor oluşturdıkları koşullarda bulunan *Bacillus* soyları yaşamlarını uzun süre hiçbir problem olmadan sürdürürler. Spor içeren kültürler, tercihen eğik jeloz üzerinde kurumaksızın oda sıcaklığı veya daha aşağı sıcaklıklarda en az 1 yıl saklanabilir (Sneath 1986).

Sporulasyon için genel olarak, belirli eser elementlerin (özellikle mangan iyonları) vejetatif hücre büyümesi için gerekli konsantrasyonlarından daha fazlası gerekir. Nutrient agarda hiç spor oluşturmayan ya da sadece birkaç spor oluşturan soylar 50 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ilavesi ile sporlaştırılabilir. Bazen $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (100 mg/l) ve $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (500 mg/l) ilavesi de yararlı olabilir (Sneath 1986).

Spor oluşturmuş ya da oluşturmamış *Bacillus* soyları vakum altında ya da soğukta uzun süre saklanabilir. Diğer Gram (+) bakteriler gibi *Bacillus* soyları da bu koşullarda yaşamlarını devam ettirirler, *Bacillus* soyları için uygun stok besi yeri skim milk agar olabilir (Sneath 1986).

Bacillus soylarının -20 ile -90°C arası sıcaklıklarda yaşayabildiğine dair bir yayın bulunmamakla birlikte, neredeyse bütün soylar % 10 (v/v) gliserol ya da % 5 (v/v) dimetil sulfoksit eklenmiş nutrient besi yerinde, sıvı nitrojende uzun süre saklanabilir (Sneath 1986).

Bazı *Bacillus* türlerinin fırsatçı patojen olmalarına karşın, gıda bozulmalarına neden olan *B. cereus* ve şarbon hastalığı etkeni *B. anthracis* bir yana, *Bacillus* cinsi tıbbi mikrobiyologlar için çok ilginç değildir (Sarrias ve ark., 2002; Sneath 1986). Bu yüzden *Bacillus* türlerinin antibiyotik duyarlılığı ile ilgili çalışmalar azdır.

Etkin antibiyotik tipi ve konsantrasyonu, antibiyotiğin vejetatif büyümeye, sporulasyona ve spor gelişimine etkisi *Bacillus* türleri arasında farklılık gösterir. Örneğin; *B. licheniformis* eritromisin ve kloramfenikole dirençli, *B. alvei*, *B. laterosporus* ve *B. stearothermophilus* sulfonamidlere duyarlı, *B. cereus* kolistin ve polimiksine dirençli, *B. sphaericus* streptomisine dirençlidir. *Bacillus* soyları genellikle penisiline duyarlıdır. *B. anthracis* soylarının bir soy dışında penisiline duyarlı olması klinik olarak önem taşımaktadır (Sneath, 1986).

Bacillus cinsi üyeleri logaritmik fazın sonunda ya da durağan fazın başlarında ikincil metabolit olarak çeşitli antibiyotikler üretirler. Yaklaşık 169 çeşit antibiyotiğin *Bacillus*lar tarafından üretildiği bulunmuştur. Örneğin *B. subtilis* soylarının 68 çeşit, *B. brevis* soylarının 23 çeşit antibiyotik üretebildiği görülmüştür. Bu antibiyotiklerin çoğu Gram pozitif organizmalar üzerinde etkilidir. *B. subtilis* tarafından üretilen subtilin, surfaktin, basilisin, difisidin, oksidifisidin, basillomisin F, *B. brevis* tarafından üretilen gramisidin S, tirosidin, *B. licheniformis* tarafından üretilen basitrasin, protisin, *B. pumilus* tarafından üretilen, pumilin, tetain ve *B. cereus* tarafından üretilen bioserin ve serksin bu antibiyotiklerden bazılarıdır (Slepecky ve Hemphill, 1992).

Üretilen bütün antibiyotiklerin işlevleri henüz tam olarak bilinmemekle birlikte birçoğunun vejetatif hücreden spor formuna geçişte etkin faktörler olabileceği düşünülmektedir (Slepecky ve Hemphill, 1992).

Bacillus soyları çok çeşitli enzimler salgılayabilme yeteneğindedirler. Her *Bacillus* soyunun en az bir hücre dışı enzim salgıladığı kanıtlanmıştır. Salgılananlar; çok çeşitli proteazlar, penisilinazlar, nükleazlar, fosfatazlar, amilaz, lipaz, fosfolipaz C, tiaminaz ve bakteriyolitik enzimlerdir. Enzimler özellikle endüstriyel uygulamalarda kullanıldığı için oldukça çok çalışılan bir mikroorganizma olan *Bacillus*, hücre dışına enzim salgılama yeteneğinden dolayı moleküler biyologların da ilgisini çekmektedir (Slepecky and Hemphill, 1992).

1.1.3. Habitat

Endosporlarının elverişsiz koşullara dayanıklılığı ve uzun süre hayatta kalabilme yeteneklerinden dolayı spor oluşturan *Bacillus* soyları çok değişik habitatlarda bulunabilir ve geniş çeşitlilik gösteren kaynaklardan izole edilebilirler. *Bacillus* türlerinin bir çoğunun başlıca habitatının toprak olduğu kabul edilmekte

ve yine bir çok türün biyopolimerleri parçalama yeteneklerinden dolayı karbon ve nitrojen döngüsünde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Toprakta alınan sporluların toz ya da diğer faktörler nedeniyle kontamine olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Sneath, 1986).

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda doğada bulunan mikroorganizma çeşitlerinin ancak % 1-5'i saptanabilmiştir. Bu oran *Bacillus*lar için de geçerli olabilir. *Bacillus*lar uç koşullarda yaşayabilme ve hücre dışı enzim salgılayabilme özelliklerinden dolayı biyoteknolojik uygulamaların başlıca odak noktaları arasında yer alırlar (Sneath, 1986).

Bacillus türlerinin izole edilebileceği habitatlar Tablo 1.1'de verilmiştir :

Tablo 1.1. *Bacillus* Soylarının İzole Edilebileceği Habitatlar (Slepecky ve Hemphill, 1992)

<i>Bacillus</i> türü	İzole edildiği habitat (lar)
<i>B. subtilis</i>	Toprak, su
<i>B. acidocaldarius</i>	Termal, asit, su, toprak
<i>B. alcalophilus</i>	Alkalen toprak
<i>B. alvei</i>	Toprak, hastalıklı arı larvası
<i>B. amylolyticus</i>	Toprak
<i>B. anthracis</i>	Antraksli hayvanlar
<i>B. azotoformans</i>	Toprak
<i>B. badius</i>	Gıdalar, deniz, dışkı
<i>B. brevis</i>	Gıdalar, toprak
<i>B. cereus</i>	Gıdalar, toprak
<i>B. circulans</i>	Toprak
<i>B. coagulans</i>	Asitli gıdalar
<i>B. fastidiosus</i>	Toprak, kümes hayvanları
<i>B. firmus</i>	Toprak
<i>B. globisporus</i>	Toprak, su
<i>B. insolitus</i>	Toprak
<i>B. larvae</i>	Hastalıklı arı larvası
<i>B. laterosporus</i>	Spor, toprak, su
<i>B. lautus</i>	Toprak, dışkı
<i>B. lentimorbus</i>	Hastalıklı balarısı larvası
<i>B. lentus</i>	Toprak, gıdalar
<i>B. licheniformis</i>	Toprak
<i>B. macerans</i>	Bitki materyalleri, gıdalar
<i>B. macquaciensis</i>	Subantartik topraklar
<i>B. marinus</i>	Deniz sedimenti
<i>B. megaterium</i>	Toprak
<i>B. mycoides</i>	Toprak
<i>B. pabuli</i>	Toprak, hayvan yemi
<i>B. pantothenicus</i>	Toprak

<i>B. pasteurii</i>	Su, toprak, lağım suyu
<i>B. popilliae</i>	Hastalıklı böcek
<i>B. psychrophilus</i>	Su, toprak
<i>B. pumilus</i>	Toprak
<i>B. schlegelii</i>	Göl sedimenti
<i>B. sphaericus</i>	Toprak, su sedimenti, gıdalar
<i>B. stearothermophilus</i>	Toprak, sıcak su kaynakları,
<i>B.thermoglucosidasius</i>	Toprak
<i>B. thuringiensis</i>	Toprak, gıdalar
<i>B. validus</i>	Toprak

1.1.4. Taksonomi

Bacillus cinsi üyelerinin sınıflandırma ve tanımlanma çalışmaları çok eskiye dayanmaktadır. Ancak bu girişimler sadece aerobik üreme ve endospor oluşturma özelliklerine dayandığı için, farklı fizyolojik karakterlere sahip ve değişik habitatlarda yaşayan bakterileri aynı grupta sınıflandırmakla sonuçlanmıştır. Fizyoloji, ekoloji ve genetiklerindeki heterojenlik *Bacillus* cinsini kategorize etmeyi ve hakkında genellemeler yapmayı zorlaştırmaktadır. Fizyolojik yaşam şekillerinin dağılımı etkileyicidir; selüloz, nişasta, proteinler, hidrokarbonları içeren bitki ve hayvansal kaynaklı bütün substratları parçalayanlar, antibiyotik üreticileri, nitrojen sabitleyenler, nitrati indirgeyenler, demir çöktürenler, selenyum oksitleyenler, mangani oksitleyen ve redükleyenler, fakültatif kemolitotroflar, asidofiller, alkalofiller, psikrofiller vb. olmak üzere *Bacillus* cinsinde tanımlanmış 145 tür bulunmaktadır. Cinsin üyelerini tanımlamak üzere fenotipik özelliklerin yanı sıra, DNA baz kompozisyonunun tayini ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları gerekmektedir (Slepecky ve Hemphill, 1992).

Literatürde tam olarak tanımlanmamış birçok *Bacillus* soyu bulunmaktadır. Bunlar genellikle *Bacillus* sp. olarak adlandırılır.

DNA hibridizasyon çalışmaları ile *Bacillus* türlerinin GC içeriğinin % 32-69 aralığında olabileceğinin gösterilmesiyle cinsin heterojenitesi ortaya çıkmıştır. Bu farklılık sadece türler arasında değil, diğer özelliklerine dayanarak aynı tür içinde tanımlanmış soylar arasında da görülmektedir. *Bacillus* taksonomisinde kullanılan diğer teknikler; fosfolipit yağ asiti analizi, pirolizis gaz-likit kromatografisi, ribozomal RNA dizilenmesi ve API kitleridir (Slepecky ve Hemphill, 1992; Hill ve ark., 2000; Ntougias ve Russell, 2000).

Genetik mühendisliğin gelişmesiyle birlikte, bakterilerin tanımlanmasında kullanılan temel yöntemlerden moleküler metodlara doğru büyük bir değişim olmuştur. Bu yaklaşımlardan en etkili olanı, evrimsel süreçte çok az değişikliğe uğramış ya da kendini tamamen korumuş olan ve küçük farklılıklarla türler arası evrimleşmeyi gösterebilen rRNA moleküllerinin kullanılmasıdır. Prokaryotlarda bu yöntemlerden en yaygını ~ 1500 baz çifti uzunluğunda olan 16S rDNA'nın dizi analizidir (Messaoud ve ark., 2003, Stackebrandt ve Lang, 1998). Ribozomal rDNA'nın dizilenmesi için 16S rDNA'nın korunmuş bölgelerine özgü "ileri" ve "ters" primerler kullanılarak 16S rRNA'yı kodlayan rDNA dizisi genomik DNA'dan PCR aracılığı ile çoğaltılarak, dizi analizi çalışmalarında kullanılabilir (Weisburg ve ark., 1991; Stackebrandt ve Lang, 1998; Tanner ve ark., 1995; Duart ve ark., 1998; Blanc ve ark., 1999; Ntougias ve Russell, 2000).

Bu teknik doğal filogenetik akrabalıkları olan canlıların taksonomisinde yardımcı olmaktadır. Yöntem, deniz bakteriyoplanktonları, toprak, hidrotermal ekosistemler ve bataklık örnekleri için başarılı bir şekilde kullanıldığı gibi, *Bacillus* taksonomi için de etkili bir yaklaşımdır (Blank ve ark., 1999). Bununla birlikte geleneksel taksonomistler *Bacillus* türlerinin 16S rDNA analizlerinin sonuçlarına göre spor oluşturmeyen türlere de akrabalık gösterdiklerini farkederek, dehşete kapılmışlardır. Bu güçlü teknikle yapılan ilk çalışmalar, *Bacillus*, *Planococcus*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus* ve *Thermoactinomyces* arasında yakın akrabalık olduğunu göstermiştir. 16S rRNA çalışmaları yuvarlak sporlu türleri (*B. sphaericus*, *B. globisporus* ve *B. amino vorans*) birlikte gruplandırmazken, *B. subtilis* ve diğer eliptik sporlu türleri (*B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*) tutarlı bir şekilde birlikte gruplandırmıştır. Ayrıca bu gruptakiler sporlu olmayan organizmalara (*B. sphaericus* *Caryophanon latum*'a, *B. globisporus* *Filibacter limicola*'ya, *B. pasteurii* *Sporosarcina urea*'ya ve *B. aminovorans* *Planococcus citreus*'a) filogenetik olarak daha yakındır (Slepecky ve Hemphill, 1992). 16S rDNA analizleri her ne kadar etkin bir yöntem ise de, birçok durumda tür karşılaştırmasında tek başına yeterli olmayabilir. Bu nedenle tür tanımlama ve soy belirlemede 16-23S rRNA spacer bölgelerinin kullanımı gerekli olmaya başlamıştır (Messaoud ve ark., 2003).

16S rRNA analizleri *Bacillus* türlerini 3 temel gruba ayırmıştır:

Tablo 1.2: 16S rRNA Analizlerine Göre *Bacillus* Türlerinin Gruplandırılması (Slepecky ve Hemphill, 1992).

Morfolojik grup	<i>B. subtilis</i> cluster 1	<i>B. alvei</i> cluster 2	<i>B. brevis</i> cluster 3
1	<i>B. subtilis</i> , , <i>B. pumilus</i> <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. smithii</i>		
2	<i>B. circulans</i> , <i>B. larvae</i> , <i>B. stearothermophilus</i>	<i>B. alvai</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. macerans</i> , <i>B. azotofixans</i> <i>B. pulvifaciens</i>	<i>B. brevis</i> , <i>B. laterosporus</i>
3	<i>B. sphaericus</i> , <i>B. thiaminolyticus</i> <i>B. alcalophilus</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. freundenreichii</i> , <i>B. aneurinolyticus</i> , <i>B. pantothenicus</i> , <i>B. insolitus</i> , <i>B. psychrophilus</i>	<i>B. macquariensis</i>	

1.1.5. *Bacillus* Cinsinin Biyoteknolojideki Yeri

Bacillus cinsi üyeleri başta hidrolitik özellikte olmak üzere birçok enzimi, bunun yanı sıra antibiyotik, yararlı biyokimyasallar ve insektisitleri üretmelerinden dolayı endüstriyel süreçlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *Bacillus* türlerinin fermentasyonu ile elde edilen ve yılda yaklaşık 100 000 ton tüketilen bir Japon yiyeceği olan “Natto” bu cinsin gıda sektöründeki kullanımının bir diğer özgün şeklidir (Harwood, 1992).

Bacillus türleri, kolay üreyebilmeleri, bulundukları kültür ortamına enzim

salgılayabilmeleri, belli türler bir yana insan ve hayvanlar için patojenitelerinin bulunmaması ve birçoğunun basit besin gereksinimleri nedeniyle endüstriyel süreçler için enzim kaynağı olarak kullanılmaktadır (Harwood, 1992).

Gıda, içecek ve deterjan endüstrilerindeki yaygın kullanımı ve düşük düzeydeki patojenitesi nedeniyle *B. subtilis*, FDA (US Food and Drug Administration) tarafından güvenli kabul edilen mikroorganizmadır (GRAS: Generally Regarded As Safe) (Harwood, 1992).

Bacillus soyları büyüme ortamına büyük miktarlarda protein salgılamaları, kolay büyütülebilmeleri ve kanıtlanmış güvenilirliklerinden dolayı heterolog protein üretiminde kullanılmaktadırlar (Harwood, 1992).

Bacillus türlerince üretilen başlıca endüstriyel enzimler; α -amilaz, β -amilaz, β -glukanaz, alkalin fosfataz, alkalin proteaz, siklodekstrin glukanotransferaz, glukoz izomeraz, pullulanaz, lipaz, β -laktamaz ve nötral proteazdır (Harwood, 1992).

Endüstriyel uygulamalarda sıcaklık kararlılığının öneminin anlaşılmasından bu yana termofilik mikroorganizmalar, termofilik amilazların üretimi için özel ilgi odağı olmuştur (Pandey ve ark., 2000). Yüksek sıcaklıklar gerektiren endüstriyel süreçlerde özellikle sıcaksever *Bacillus* soyları tercih edilmektedir (Harwood, 1992). *Bacillus* türlerinin hemen hepsi amilaz üretmekle beraber, *B. azotoformans*, *B. badius*, *B. fastidiosus*, *B. insolitus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentimorbus*, *B. marinus*, *B. pasteurii*, *B. popilliae*, *B. pumilus*, *B. schlegelli* ve *B. sphaericus*'un nişasta hidrolizi yapmadığı bilinmektedir. Endüstride en çok kullanılan amilaz üreticileri ise *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens*'tir. Tablo 1.3' de bazı *Bacillus* türlerinden elde edilen α -amilazlar ve saptanan bazı özellikleri verilmiştir:

Tablo 1.3. Bazı *Bacillus* Türlerinden Elde Edilen α -Amilazların Özellikleri (Pandey ve ark., 2000; Haki ve Rakshit, 2003)

Kaynak	Molekül ağırlığı (Da)	Optimum pH	Optimum sıcaklık
<i>Bacillus sp.</i>	110 000-140 000	5.5	90
<i>Bacillus sp.</i>	90 000	11.0-12.0	60
<i>Bacillus sp.</i>	42 000-150 000	9.0	70
<i>B. flavothermus</i>		5.5-6.0	60
<i>B. licheniformis</i>	58 000	6.0-6.5	90
<i>B. licheniformis</i>	64 000	6.0-6.5	90
<i>B. lentus</i>	49 000	6.1	70
<i>B. megaterium</i>	59 000		
<i>B. subtilis</i>	54 780	5.6	80
<i>B. subtilis</i>		5.4-6.4	50
<i>B. subtilis</i>	57 700	6.5	50
<i>B. amyloliquefaciens</i>		7.0	70
<i>B. stearothermophilus</i>		5.0-6.0	70-80
<i>B. licheniformis</i>		6.0-6.5	100

1.2. α -AMİLAZ ENZİMİ

Amilazların tarihi Kirchhoff'un 1811 yılında nişasta parçalayan ilk enzimi bulmasıyla başlamıştır. Bunu, parçalayıcı amilazların ve malt amilazların bulunduğu birkaç yayın takip etmiştir. Bundan çok sonra 1930'da Ohlson malttaki nişastayı parçalayan enzimleri, enzimatik reaksiyon ile üretilen şekerlerin anomerik tipine göre α - ve β -amilazlar olarak sınıflandırmıştır. α -amilaz (1,4- α -D-glukan-glukanhidrolaz, E.C.3.2.1.1) salgılanan enzimler arasında oldukça önemli bir yer tutar. Bugüne değin çeşitli kaynaklardan elde edilen α -amilazlar oldukça ayrıntılı şekilde çalışılmıştır (Gupta ve ark., 2003).

α -Amilaz nişasta ve ilgili oligosakkaritlerdeki α -1,4 glikozidik bağları hidroliz eden bir enzimdir. Bunun yanı sıra, α -1,6 glikozidik bağlarını hidroliz eden bir α -amilaz *Thermococcus profundus*'dan elde edilmiştir (Kwak ve ark., 1998).

Nişasta kolay bulunan bir enerji kaynağıdır. Bitki hücrelerinde veya tohumlarda sitoplazmada çok miktarda bulunmaktadır. Nişastanın büyük molekül ağırlıklı iki parçası; α -1,4 bağlı glukopironoz rezidülerinden meydana gelen doğrusal bir polimer olan amiloz ve α -1,4 glikozidik bağlarına ek olarak, her 17-26 glukoz ünitesinde bir dallanma noktaları içeren amilopektindir (Khajeh ve ark., 2001). Amiloz, nişastanın molekül ağırlığının % 15-25, amilopektin ise % 75-85'ini oluşturur. Suda çözünmeyen miseller oluşturan α -amiloz zincirlerinin molekül ağırlıkları, çözeltide kolloidal form ve miseller oluşturan amilopektinden yaklaşık bir milyon kat daha küçüktür (Bertoldo ve Antranikian 2002).

Nişastanın karmaşık yapısından dolayı hücreler nişastanın oligosakkaritlere ve glukoz ve maltoz gibi daha küçük şekerlere ayrılması için uygun enzimlere gereksinim duyarlar. Bu enzimler basit olarak 2 gruba ayrılır:

- 1-) "Endo-acting" ya da "endo-hydrolases" adı verilen içten hidroliz eden enzimler
- 2-) "Exo-acting" ya da "exo-hydrolases" adı verilen dıştan hidroliz eden enzimler

α -Amilaz gibi içten etki eden enzimler nişasta polimerinin içteki bağlarını rastgele hidroliz ederek, doğrusal ve dallanmış oligosakkaritlerin oluşumunu sağlarlar (Bertoldo ve Antranikian 2002). Ancak α -amilazlara dirençli nişastanın da bulunduğu bilinmektedir (Bergmann ve ark., 1998). Dıştan etkileyen nişasta

hidrolazları β -amilaz, glukoamilaz ve α -glukozidaz olup, ve bu enzimler substratın indirgenmemiş ucunda küçük oligosakkaritler meydana getirir (Bertoldo ve Antranikian 2002; Duedahl-Olesen ve ark., 2000).

Geniş endüstriyel uygulamaları ile günümüz biyoteknolojisinde büyük önem taşıyan amilazlar bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilir, ancak endüstride genellikle mikrobiyal enzimler tercih edilmektedir. Bugün birçok mikrobiyal enzim ticari olarak elde edilebilir durumdadır ve nişasta endüstrisinde enzim kullanımı kimyasal hidrolizin yerini almış bulunmaktadır (Kandra 2003). Bakteriyel ve fungal kaynaklı α -amilazlar, özellikle de *Bacillus* türlerinden elde edilen enzimler arasında yüksek kararlılık gösterenler, endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Prub ve ark., 1999; Pandey ve ark., 2000; Burg 2003, Demirjian ve ark., 2001). Sıcaklık kararlılığı yüksek α -amilazlarla yapılan yeni araştırmalar termofil ve uç termofiller üzerinde yoğunlaşmıştır (Bolton ve ark., 1997).

1.2.1. Amilazın mikroorganizmalar arasında dağılımı

α -Amilaz kaynakları hayvan, bitki ve mikroorganizmalar arasında geniş bir dağılım göstermektedir. Son yıllarda çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen hücre dışı α -amilazlarla ilgili çalışmalar oldukça fazladır. Amilaz üretimi için mikroorganizmaların kullanılmasının en büyük avantajı, ekonomik üretim kapasitesi ve istenen nitelikte enzim elde etmek için kolay manipüle edilmeleridir. α -Amilazlar mantar, maya, bakteri ve aktinomiset kaynaklı olabilir (Gupta ve ark., 2003). Bununla birlikte fungal ve bakteriyel kaynaklı enzimler endüstriyel sektörlerdeki uygulamalarda baskındır (Gupta ve ark., 2003). α -Amilaz kaynakları arasında *Aspergillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Halobacterium*, *Thermus*, *Thermoanaerobacter* türleri sayılabilir (Pandey ve ark., 2000; Bertoldo ve Antranikian 2002).

1.2.2. α -Amilaz aktivitesinin belirlenmesi

α -Amilazların analizinde substrat olarak genellikle çözünebilir nişasta ya da modifiye nişasta kullanılır. α -Amilaz, nişastadaki α -1,4 glikozidik bağlarının hidrolizini katalize ederek glukoz, dekstrin ve limit dekstrin oluşumunu sağlar. Reaksiyonun sonucu, indirgenen şeker miktarındaki artış ya da iyot ile boyanmış

substrat rengindeki azalışla gözlemlenir. α -Amilaz aktivitesinin belirlenmesi için çeşitli metotlar vardır. Bunlar:

- Nişasta- iyot renk yoğunluğunda azalma,
- Dekstrinleşme aktivitesi tayini,
- Sandstedt Kneen ve Blish metodu,
- Indian pharmacopoeia metodu,
- İndirgenen şeker artışı ya da dinitrosalisilik asit (DNSA) metodu,
- Nişasta süspansiyonunun viskozitesindeki azalış,
- Falling number (FN) metodu ve
- Amilograf / Farinograf testidir. (Gupta ve ark., 2003)

1.2.3. α -Amilazın biyokimyasal özellikleri

Substrat özgülüğü: Diğer enzimler gibi α -amilazın substrat özgülüğü de mikroorganizmadan mikroorganizmaya değişkenlik gösterir. Genelde, α -amilazlar en yüksek özgülüğü nişastaya, daha sonra sırasıyla amiloz, amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioza gösterirler (Gupta ve ark., 2003).

Optimum pH ve kararlılık: α -Amilazların optimum pH'ları 2 ile 12 arasında değişir. Birçok bakteriyel ve fungal amilazın optimal pH'sı asidik- nötral aralıklarda bulunur. *Alicyclobacillus acidocaldarius* α -amilazı pH 3'te optimum aktivite gösterirken, alkalofilik *Bacillus* türlerinden pH 9-10.5 arasında optimum aktivite gösteren alkali amilazlar rapor edilmiştir. Uç düzeyde alkalofilik bir α -amilaz *Bacillus* sp. GM8901' de bulunmuş ve optimal pH değeri 11-12 olarak belirtilmiştir. Optimum pH *B. stearothermophilus* DONK BS-1' de olduğu gibi sıcaklığa ya da *B. stearothermophilus*' ta olduğu gibi kalsiyuma bağlı olabilir.

α -Amilazlar genellikle 4-11 gibi geniş bir pH aralığında kararlıdır, ancak dar pH aralıklarında kararlılık gösteren α -amilazlar olduğu da bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2003).

Optimum sıcaklık ve kararlılık: α -Amilaz aktivitesi için optimum sıcaklık mikroorganizma büyümesine bağlıdır. En düşük optimum sıcaklık *F. oxysporum* amilazı için 25-30°C ve en yüksek optimum sıcaklık ise arkeabakteriler olan *Pyrococcus furiosus* ve *Pyrococcus woesei* amilazları için sırasıyla 100 ve 130°C olarak bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2003). Sıcaklık kararlılığı gösteren α -amilazlar, kullandıkları süreçlerdeki yüksek sıcaklık gereksiniminin yanı sıra, genellikle

uygulamalarda kontaminasyon riskinin azalması ve reaksiyon zamanının kısılması nedeniyle de tercih edilirler (Pandey ve ark., 2000). Başta kalsiyum ve substrat olmak üzere sıcaklık kararlılığını etkileyen birçok faktör vardır (Gupta ve ark., 2003).

Molekül ağırlığı: α -Amilazların molekül ağırlıkları 10 ile 210 kDa arasında değişkenlik gösterir. *B. caldolyticus*'dan izole edilen enzim 10 kDa, buna karşın *Chloroflexus aurantiacus*'tan izole edilen α -amilaz 210 kDa büyüklüğündedir. Yine de mikrobiyal α -amilazların molekül ağırlıkları genellikle 50-60 kDa' dır (Gupta ve ark., 2003).

İnhibitörler: Birçok metal katyonu, özellikle ağır metal iyonları, sülfidril grubu bileşikleri, N-bromosüksinimid, P-hidroksil merküribenzoik asit, iyodoasetat, BSA, EDTA ve EGDA α -amilazları inhibe etmektedir (Gupta ve ark., 2003).

α -Amilaz kararlılığı ve kalsiyum: α -Amilaz en az bir Ca^{2+} iyonu içeren bir metallo enzimdir. Ca^{2+} 'un α -amilaza olan ilgisi diğer iyonlardan daha güçlüdür. Enzime bağlı kalsiyum miktarı 1-10 arasında değişmektedir. Crystalline Taka-amilaz A (TAA)'nın 10 tane Ca^{2+} iyonu içermesine karşın bunlardan sadece bir tanesi enzime sıkı bağlıdır. Diğer sistemlerde enzim kararlılığı için genellikle bir Ca^{2+} iyonu yeterlidir. Ca^{2+} amilazlardan diyaliz ya da elektrodializle ayrılabilir. Kalsiyumsuz enzimler bu iyonun eklenmesiyle reaktif edilebilmektedir. α -Amilazlar Ca^{2+} varlığında sıcaklığa, bu iyonun bulunmadığı koşullara görece çok daha dayanıklıdır. Ancak buna rağmen Ca^{2+} 'un enzim üzerinde hiçbir etki göstermediği durumlar da bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2003).

1.3. α -Amilazların endüstriyel uygulamaları

Amilazlar nişastaya dayalı bütün endüstriler için en önemli hidrolitik enzimlerdir ve amilazın ticarileşmesi ilk olarak 1984'te sindirim bozukluğu hastaları için farmasötik olarak kullanılmasıyla başlar. Bugün amilazlar birçok endüstriyel süreçte (gıda, deterjan, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi) nişasta hidrolizi için uygulama alanı bulmaktadır. Bu bağlamda, mikrobiyal amilazlar nişasta endüstrisinde kimyasal hidrolizin yerini tamamen almıştır. Ayrıca α -amilazlar farmasötik ve kimya endüstrilerinde de kullanım alanı bulunmaktadır. Günümüzde amilazlar dünya enzim pazarındaki en büyük paya sahiptir (Gupta ve ark., 2003).

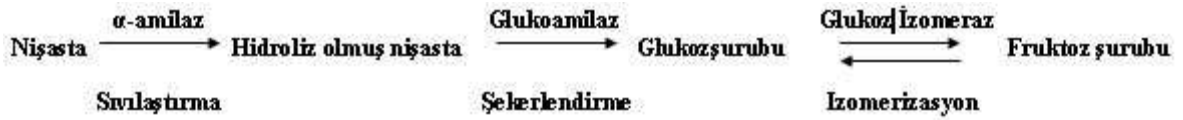
1.3.1. Ekmek ve fırıncılık endüstrisinde kullanımı

Fırıncılık endüstrisinde α -amilazlar yüzyıllardır geniş çeşitlilikle yüksek kalitede ürün elde edilmesi için kullanılmaktadır. Son yıllarda, malt ve mikrobiyal kökenli enzimlerin kullanımı belirgin şekilde artmıştır. Bu enzimler ekmek ve simitlerde bu ürünleri daha fazla kabartmak, daha iyi renk ve daha fazla yumuşaklık için kullanılır. Bugün, ekmek endüstrisinde birçok enzim preparasyonu (proteazlar, lipazlar, ksilanazlar, pullulanazlar, pentosanazlar, sellülozlar, glukoz oksidazlar, lipoksigenazlar vb.) çeşitli amaçlar için kullanılmakla birlikte, hiçbirisi α -amilazların yerini tutamamaktadır. Bugüne dek, pastacılıkta kullanılan α -amilazlar arpa maltından elde edilen tahıl enzimi ile bakteri ve funguslardan elde edilen mikrobiyal enzimlerdir. Fungal α -amilazlar 1955'ten itibaren ABD'de ve 1963'ten bu yana İngiltere'de güvenli olarak kabul edildikten sonra, ekmek katkı maddesi olarak kullanılmalarına izin verilmiştir. Şimdilerde ise bütün dünyada farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Yeni endüstriyel α -amilaz uygulamalarından biri, ürünlerin bayatlama sürelerinin geciktirilmesi, bir diğer deyişle bu ürünlerin raf ömrünün arttırılmasıdır. Ekmeğin bayatlamasını önlemek ve ürünlerin yapısını geliştirmek için geleneksel olarak çeşitli maddeler eklenmektedir. Bunlar, kimyasallar, küçük şekerler, enzim/enzim kombinasyonları, süt tozu, emülsifiye edici maddeler, monogliseritler / digliseritler, şeker esterleri, lektin gibi maddeler olabilmektedir. Yeni eğilim ise hamur geliştirilmesinde bayatlamayı önlemek için α -amilaz, maltojenik amilaz, β -amilaz, amiloglukozidazlar gibi enzimlerin kullanılmasıdır. Ayrıca pullulanaz ve α -amilaz kombinasyonu da bayatlamaya karşı etkili bir ajan olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, gereğinden fazla kullanılan α -amilaz ekmekte istenmeyen bir yapışkanlığa neden olabilir. Bunu engellemek üzere ara

sıcaklıklarda kararlı α -amilazların kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Bu nitelikteki enzimler nişastanın jelatinizasyonundan sonra aktiftir, ancak pişirme sürecinin tamamlanmasından önce aktivitelerini kaybederler. Birçok çeşit mikrobiyal α -amilaz bilinmesine rağmen, bu özelliğe sahip olan α -amilaz sadece birkaç mikroorganizmada rapor edilmiştir (Gupta ve ark., 2003).

1.3.2. Nişasta sıvılaşması ve şekerleşmesi

α -amilazların en büyük pazarı glukoz ve fruktoz gibi nişasta hidrolizatlarının üretimidir. Nişasta fruktoz şuruplarına dönüştürülür ve yüksek düzeydeki şeker özelliklerinden dolayı bu şuruplar içecek endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılırlar (Gupta ve ark., 2003). Amilaz enzimi nişastanın fruktoz ve glukoz şuruplarına dönüşümünde ilk basamak olan nişastanın sıvılaşma sürecinde endüstriyel enzim olarak kullanılmaktadır.



(Crabb ve Mitchinson 1997; Shaw ve ark., 1999)

Sıvılaştırma basamağı 95-105°C'ta, şekerlendirme basamağı ise 60-62°C ta gerçekleştiği için yüksek sıcaklığa dayanıklı enzimler tercih edilmektedir (Prub ve ark., 1999; Crabb ve Mitchinson 1997; Shaw ve ark., 1999)

1.3.3. Tekstil endüstrisi

Kumaşların modern üretim süreçlerinde, dokuma sırasında dokunun zarar görmemesi gerekir. İplik bu süreçlerde kopmadan korunmalıdır. Bu yüzden ipliklerin üzerine kaldırılabilir bir tabaka uygulanır. Bu özellikte tabakalar oluşturmak için kullanılan materyaller oldukça farklıdır. Nişasta ucuz olması ve kolay bulunabilmesi nedeniyle bu iş için çok uygun bir maddedir ve nişastanın kumaştan kaldırılması sadece bu tabakaya etki eden ve lifleri (iplikleri) etkilemeyen α -amilazlar uygulanılarak başılır. Enzim nişastayı suda çözünebilen ve yıkamayla giderilebilen dekstrinlere parçalar (Gupta ve ark., 2003).

1.3.4. Kağıt endüstrisi

Kumaşlarda olduğu gibi kağıt da üretim süreci boyunca mekanik zararlardan korunmalıdır. Bu, kağıdın son halinin kalitesini, sertliğini, dayanıklılığını ve silinebilirliğini de iyileştirir. Bu tür uygulamalar için nişasta uygun bir maddedir.

Nişasta kağıda presleme aşamasında uygulanır ve kağıt ruloları aradaki nişasta sayesinde kolayca yuvarlanır. Bu süreç 45-60°C sıcaklıkta gerçekleşmektedir. Bu aşamada tekrar edilebilir sonuç alınabilmesi için nişasta akışkanlığı sabit olmalıdır. Diğerk bir deyişle kullanılan nişastanın akışkanlığı elde edilen kağıt kalitesini belirleyen başlıca etkenlerden birisidir. Doğal nişastanın viskozitesi kağıt biçimlendirmek için çok yüksektir ve bir “batch” ya da sürekli proseste nişastanın akışkanlığı, α -amilaz ile kısmen parçalanmasına bağlı olarak ayarlanmaktadır. Kullanılan nişasta ve α -amilazın kaynağı belirleyicidir. Kağıt endüstrisinde kullanılan amilazlar: Amizyme® (PMP fermentation Products, Peoria, USA), Termamyl®, Fungamyl, BAN® (Novozymes, Denmark) ve α -amylase G 9995® (Enzyme Biosystems, USA) (Gupta ve ark., 2003).

1.3.5. Deterjan endüstrisi

Enzimler günümüzde kullanılan deterjan katkı maddeleri arasında önemli yer tutmaktadır. Enzim içeren deterjanların en büyük avantajı, enzimsiz deterjanlara göreceli daha ılımlı koşullarda kullanılabilmeleridir. İlk üretilen bulaşık deterjanları çok sert olduğu ve hasar yarattığı için deterjan endüstrisinde daha yumuşak ve çok daha etkili materyaller gereksinilmiştir. α -Amilazlar 1975 yılından bu yana çamaşır deterjanlarında kullanılmaktadır. Günümüzde, sıvı deterjanların % 90’ı α -amilaz içermektedir ve bulaşık makineleri için α -amilaz kullanımı giderek artmaktadır. Deterjanlarda α -amilaz kullanımını sınırlayan etkenlerden birisi enzimin kalsiyuma duyarlı olması ve düşük kalsiyumlu bir ortamda kararlılığının şiddetle azalmasıdır. Ek olarak bir çok yaban tipi α -amilaz deterjanların içeriğinde bulunan oksidanlara duyarlıdır. Ev tipi deterjanlarda oksidanlara karşı kararlılık, proteaz gibi diğerk bazı enzimler kullanılarak başarılabilmektedir. İki büyük deterjan üreticisi firma olan Novozymes ve Genencore amilazların kararlılığını arttırmak üzere yeni bir yaklaşım olarak protein mühendisliği tekniklerini kullanmışlardır (Gupta ve ark., 2003).

Belirtilen endüstriyel süreçlerin yanı sıra, yeni biyoteknolojik uygulamaların artmasıyla, amilazların kullanım yelpazesi klinik, ilaç ve analitik kimya gibi alanlara doğru genişlemiştir.

1.4. Tezin Amacı

Gıda, tekstil, deterjan, klinik ve analitik kimya gibi geniş bir endüstriyel kullanım alanı olan α -amilazlar bugünün biyoteknolojisinin vazgeçilmez enzimleri arasındadır. Böylesine işlevsel bir enzimin endüstriyel süreçlere uygun, ancak farklı nitelikteki çeşitlerinin bulunması ve uygulamaya aktarımı bugün birçok araştırmacının hedefi olmuştur.

Bu tez çalışması ülkemizdeki yerel kaynaklardan α -amilaz üreticisi soyların izole edilmesi, taranarak seçilmesini, tanımlanması, enzim aktivitelerinin belirlenmesi ve enzim üretiminin optimizasyonunu gerçekleştirmek üzere planlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Sarf Malzemesi

Üretici Firma

[α - ³⁵ S] dATP (10 MBq > 37 TBq/mmol (> 1000 Ci/mmol))	IZOTOP KS-203
(NH ₄) ₂ SO ₄	MERCK 1.01216.1000
2-Propanol	RIEDEL 24137
3-5-dinitrosalisilik asit	SIGMA D 0550
Agar	BD 214010
Agaroz	SIGMA A-6013
Akrilamit	SIGMA A 8099
Amonyum per sülfat	BIORAD 161-0700
Asetik Asit	RIEDEL 27225
Bisakrilamit	BIORAD 161-0201
Borik Asit	SIGMA b 7660
Brillant Blue R	SIGMA B 7920
Bromofenol blue	SIGMA B-6131
CaCl ₂ .2H ₂ O	SIGMA C-3306
CTAB	MERCK 1.02342.0100
CuCl ₂ .2H ₂ O	SIGMA-ALDRICH C-6641
Çözünür nişasta	SIGMA S 2630
Etanol	J. T. BAKER 8228
Etidyum Bromür	SIGMA E-7637
Fenol	MERCK 100200
FeSO ₄ .7H ₂ O	SIGMA F-7002
Formamid	SIGMA D 4551
Fuksin Sulu Boyası	GBL 2424
Gliserol	RIEDEL 15524
Glukoz	SIGMA G-8270

H ₃ BO ₃	SIGMA B-7660
İmmersiyon Yağı	MERCK 1.04699. 0100
İzoamil Alkol	MERCK 1.00978.1000
K ₂ HPO ₄	MERCK 1.05101.1000
KCl	RIEDEL 12636
KH ₂ PO ₄	RIEDEL 04243
Kloroform	J.T. BAKER 7386
Kristal Moru Boyası	GBL 2434
Ksilen Siyanol	SIGMA X 4126
Lugol Çözeltilisi	GBL 2435
Maltoz	SIGMA M 2250
Meat ekstrakt	OXOID L 29
MgSO ₄ .7H ₂ O	SIGMA M-2773
MnSO ₄ .H ₂ O	SIGMA M-7634
Na ₂ CO ₃	MERCK 1.06392.1000
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	SIGMA-ALDRICH M-1003
NaCl	MERCK 1.06400.1000
NaH ₂ PO ₄	RIEDEL 0.4269
NaNO ₃	SIGMA S-8170
NaOH	MERCK 1.06462.1000
Nutrient Broth	DIFCO 234000
Pepton	BD 211693
Protein Standartı	SIGMA SDS-6H
Proteinaz K	ROCHE 1 373 196
Rezin (Anyon ve katyon değıştirici)	BIORAD 142-6425
SDS	SIGMA 5750
Sodyum Asetat	RIEDEL 25022
Sodyum potasyum tartarat	SIGMA S 2377
TEMED	SIGMA T 7024
Trikloro asteik asit	RIEDEL 27242
Triptik Soy besi yeri	ACUMEDIA 7164

Tripton	ACUMEDIA 7351A
Tris baz	SIGMA T-1503
Tris-HCL	MERCK 108986
Üre	BIORAD 161-0731
Yeast ekstrakt	MERCK 1.03753
β -Merkaptoetanol	SIGMA M-6250
λ DNA	MBI-FERMENTAS

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Üretici Firma

+4 °C Soğutucu	ARİSTON NOFROST
-20 °C dondurucu	ARİSTON NOFROST
-80 °C dondurucu	HERAEUS INSTRUMENT
Agaroz Gel Elektroforezi Sistemi	BIOMETRA/AgaGel Mini
Buz Makinesi	BAR LINE BF 85
Densitometre	BIOMERIEUX-Densimat
Etüv	EDMUNT BÜHLER-TH 15
Güç Kaynağı	BIOLAB, Elite 300 plus
Hassas Terazı	SARTORIUS-BL 210S
İnkübatör	CERTOMAT-BS-T
Jel Görüntüleme Monitörü	SONY, PUM-95E
Jel Görüntüleme Sistemi	VILBER LOURMAT TFX-20M
Jel Görüntüleme Yazıcısı	UP-890 CE
Liyofilizatör	JOUN RC-10.10
Liyofilizatör Soğutucu Motoru	JOUN RCT90
Liyofilizatör Vakum Motoru	ALCATEL Pascal 2005 C1
Manyetik Karıştırıcı	HEIDOLPH MR3001
Masa Üstü Santrifüj	HERAEUS Sepatech, Biofuge 15R
Mikrodalga Fırın	BEKO-1550
Mikroskop	NIKON-Alphaphot 2-YS 2
Orbital Karıştırıcı	BIOMETRA WT12
Otoklav	HIRAYAMA-HICLAVE HVE-50

Otoklav	VARIOKLAV-Dampfsterilizator 300
Otomatik Pipet 1000 µl	GILSON
Otomatik Pipet 200 µl	GILSON
pH Metre	İNOLAB pH LEVEL 1
Protein Elektroforezi Sistemi	BIORAD Mini Protean II
Spektrofotometre	BİORAD-Smartspec 3000
Steril Kabin	HERAEUS-Herasafe-HS 12
Sterilizatör	BİNDER-ED115
Su Banyosu	JULABO-SW 21
Su Banyosu	JULABO-MP 13
Terazi	SARTORIUS-BL 3100
U.V. Transillüminatör	VILBER LOURMAT V026347
Vorteks	IKA-MS 2-Minishaker

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin toplanması

Afyon, Bursa ve Yalova illerinde bulunan termal kaynaklardan alınan su ve toprak örnekleri ile Edremit yöresinde bulunan zeytin işletmelerinden sağlanan karasu ve pirina örneklerine ait özellikler Tablo 2.1’de verilmiştir. Bunlara ek olarak bozulmuş tereyağı örnek kaynağı olarak kullanılmıştır. Toplanan materyallerden su örnekleri ile karasu ve pirina örnekleri steril şişelere, toprak örnekleri ise kilitli torbalara alınarak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Alınan tüm materyallerin uzun süreli saklanması +4 °C’ ta gerçekleştirilmiştir.

2.2.2. Primer İzolasyon

Tablo 2.1. Toprak ve Su Örneklerinin Yeri ve Özellikleri

Örnek Kodu	Örnek kaynağı	Örnek Tipi	Sıcaklık (°C)	pH
T1	Yalova Mantar Çiftliği	Sarılmış Kompost		
T2	Afyon Heybeli Kaplıcası	Toprak	48	9
T7	Afyon Gecek Kaplıcası	Toprak	15	8
T8	Afyon Gecek Kaplıcası	Toprak	26	
T10	Afyon Gecek Kaplıcası	Toprak	48	8
T11	Afyon Ömer Kaplıcası	Toprak	55	
T12	Bursa Kara Mustafa Kaplıcası	Tortu		
T13	Afyon Ömer Kaplıcası	Toprak	15 (Ortam)	
T14	Afyon Ömer Kaplıcası	Toprak	80	
T16	Gönen Dağ Ilıcısı	Toprak	40	
T17	Yalova Mantar Çiftliği	Torf		
S1	Manyas Serpin Kaplıcası	Su	53	7
S2	Gönen Dağ Ilıcısı-1	Su	43	7
S3	Gönen Dağ Ilıcısı-2	Su	43	8
S5	Gönen Dağ Ilıcısı-Acı su	Su		5
S6	Gönen Yıldız Otel- G10	Su	75	7
S7	Gönen Yıldız Otel-G7	Su	58	7
S9	Bursa Askeri Hastanesi	Su	45.2	7
S10	Bursa Yeni Kaplıca	Su	81	8
S12	Bursa Kara Mustafa Kaplıcası	Su	63	7
A1	Afyon Heybeli Kaplıcası	Su	58	8
A2	Afyon Gazlıgöl Kaplıcası	Su	65	7,5-8
A3	Afyon Gazlıgöl Kaplıcası	Su	69	8
A4	Afyon Gazlıgöl Kaplıcası	Su	29	
A5	Afyon Oruçoğlu Kaplıcası	Su		
A9	Afyon Gecek Kaplıcası	Su	96	9
A12	Afyon Ömer Kaplıcası	Su	104	
A15	Afyon İkbāl Kaplıcası	Su	43	7
A16	Afyon Çay Ilıcısı	Su	38	7
KARA	Edremit Zeytin İşletmesi	Karasu		
PİRİNA	Edremit Zeytin İşletmesi	Prina		
TERE	Tereyağı	Bozulmuş tereyağı		

2.2.2.1. Primer İzolasyonun Yapıldığı Besi Yerleri

Nutrient broth: 3 g beef ekstrakt, 5 g pepton, distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır (pH 6.8). 121°C'ta 20 dakika otoklav edilerek steril edilir (Sneath, 1986).

Nutrient agar: 3 g beef ekstrakt, 5 g pepton, 15 g agar, distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır (pH 6.8). Isıtılarak karıştırılır. 121°C'ta 20 dakika otoklav edilerek steril edilir (Sneath, 1986).

L- agar: 10 g tripton, 5 g yeast ekstrakt, 5 g NaCl, 15 g agar, ısıtılarak karıştırılır. Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır (pH 7). 121°C'ta 20 dakika otoklav edilerek steril edilir (Travers ve ark., 1987).

Minimal besi yeri: 10 g glukoz, 4 g NaNO₃, 0,01 g CaCl₂, 0,5 g MgSO₄.7H₂O, 1 g KCl, 0,01 g FeSO₄, 0,5 g K₂HPO₄, 0,5 g KH₂PO₄, distile su ile 1000 ml 'ye tamamlanarak 121°C'ta 20 dakika otoklav edilir. Minimal besi yeri için eser element solüsyonu; % 0,026 B, % 0,05 Cu, % 0,05 Mn, % 0,06 Mo, % 0,07 Zn, distile su içinde çözüldükten sonra 121°C'ta 20 dakika otoklav edilir. Son hacim % 0,005 olacak şekilde minimal besi yerine eklenir (Llarch ve ark., 1997).

Triptik Soy Broth: 30 g triptik soy broth, 7 g NaCl, 0,36 g tris 1000 ml distile su içinde çözüldükten sonra 121°C'ta 20 dakika otoklav edilir (Sneath, 1986).

M-9 besi yeri (% 1 çözüdür nişasta içeren): 10 g çözüdür nişasta, 2,5 g (NH₄)₂ SO₄, 0,3 g MgSO₄.7H₂O, 0,2 g CaCl₂, 2 g pepton, 2 g yeast ekstrakt 1000 ml distile su içinde çözülür sonra 121°C'ta 20 dakika otoklav edildikten sonra üzerine minimal besi yeri için kullanılan eser element solüsyonundan 1 ml eklenir (pH 6.7) (Ali ve ark., 1999).

Asidofilik besi yeri : A çözeltisi: 0,4 g (NH₄)₂SO₄, 1 g MgSO₄, 0,5 g CaCl₂.2H₂O, 6 g KH₂PO₄, distile su ile 1000 ml' ye tamamlanır.

B çözeltisi: 2 g glukoz, 2 g yeast ekstrakt, distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

A ve B çözelteleri ayrı ayrı otoklav edildikten sonra (121°C, 20 dakika) karıştırılır (Sneath, 1986).

2.2.2.2. Primer İzolasyon Yöntemleri

Su örnekleri için : Su örneklerine ait ilk çalışmada, paralel 2 set halinde hazırlanan 5 ml nutrient broth, 1 ml su örneği ile aşılanmış ve bir set 75°C'ta 10 dakika pastörize edilmiştir. Diğer sete pastörizasyon işlemi uygulanmamıştır. Pastörize ve pastörize olmayan kültürler 37°C'ta 170 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üreme gözlenen kültürlerden 100'er µl alınarak iki tanesi pH 7 ve iki tanesi pH 10 nutrient agar içeren ve her örnek için toplam 4 adet hazırlanan petrilere yayılmıştır. Ekim yapılan pH 7 ve pH 10 nutrient agar petrilerinden bir seti 30°C'ta diğer set ise 55°C'ta inkübasyona bırakılmıştır.

İkinci çalışmada ise, ilk çalışmada iyi üreme gözlenen ve çok sayıda koloninin seçilerek saklandığı su örnekleri çalışmaya alınmamış, az sayıda koloni izole edilen su örneklerinden 1µl alınarak, 5 ml'lik Minimal besi yeri, M-9 besi yeri, asidofilik besi yeri ve Triptik soy broth besi yerlerine aşılanmıştır. Buna göre Minimal, M-9 ve Triptik soy broth besi yerlerine aşılanan örnekler için inkübasyon sıcaklıkları 30, 45 ve 70°C, asidofilik besi yerine aşılanan tek bir su örneği için ise 30 ve 45°C olarak uygulanmıştır. İnkübasyon sonrasında üreme gözlenen örneklerden 100'er µl alınarak, inkübe edildikleri besi yerlerinin agar içeren türlerine ve paralel olarak Nutrient agar besi yerine yayılmıştır. Agarlı besi yerlerine alınan örnekler 30, 45 ve 55°C'ta inkübe edilmiştir.

Toprak örnekleri için : Toprak örnekleri 2 set halinde çalışılmıştır:

a-)Sıcaklık uygulaması ile pastörizasyon :

4 g toprak örneği, 20 ml distile su ile ve vorteks kullanılarak karıştırılmıştır. Daha sonra 80 °C su banyosunda 150 rpm'de 20 dakika çalkalanarak pastörize edilmiştir.

b-) Etanol uygulaması ile pastörizasyon :

4 g toprak örneği, 20 ml % 50 etanol ile karıştırıldıktan sonra çalkalamalı etüvde 30° C'ta 150 rpm'de 1 saat pastörize edilmiştir.

a ve b'de hazırlanan örnekler distile su ile 10⁻¹ ve 10⁻³ oranında sulandırıldıktan sonra 100'er µl alınarak L -agar petrilerine yayılmıştır.

Karasu, pirina ve tereyağı örnekleri için: 1 ml karasu, pirina ve 1 g tereyağı 5 ml steril suya alınarak bir seti 75°C'ta 10 dakika pastörize edilmiştir. Diğer set pastörizasyon işlemi uygulanmadan inkübasyona bırakılmıştır.

Bütün çalışmalarda katı besi yerinde tek koloni halinde üreyen ve morfolojik olarak *Bacillus* kolonilerinin gösterdiği özellikleri taşıdığı gözlenen koloniler Gram boyama ile boyanmış, yapılan mikroskopik incelemede Gram (+) sporlu çomak olduğu tespit edilen soylar saflaştırılarak nutrient agar eğik jelozlarında üretilmiş ve yeniden çalışılana dek +4°C' ta saklanmıştır.

2.2.3. α -Amilaz üreticisi soylarını seçimi

Elde edilen izolatların α -amilaz üretkenliğini belirlemek üzere bu soylar nişasta agar üzerinde test edilmiş ve verdikleri halolar değerlendirilmiştir.

2.2.3.1. Kullanılan besi yeri

Nişasta agar: 3 g meat (ya da beef) ekstrakt, 10 g çözünür nişasta, 12 g agar tartılır, bir miktar distile su içinde nişasta tamamen çözünene kadar karıştırılarak ısıtılır. Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Hazırlanan çözelti daha sonra 120°C'ta 15 dakika otoklav edilir. Steril besi yeri 45°C'a kadar soğutulduktan sonra petrilere dökülür (Lawler ve ark., 2000; Martins ve ark., 2001).

2.2.3.2. Yöntem

Test edilecek örnekler, steril kürdan yardımı ile içinde ~25 ml'lik nutrient agar içeren petri kaplarında uygun kareye ekilerek 30°C' ta 1 gece inkübasyona bırakılır.

Üreyen koloniler 24 saat sonra yine steril kürdan yardımı ile pH 7 ve pH 10 nişasta agar petrilere paralel olarak ekilir ve 30°C'ta 24-48 saat inkübe edilir. Inkübasyon sonrası Gram's iodine solüsyonu (lugol) bir sprey yardımı ile ve petrilerin yüzeylerini kaplayacak şekilde dökülür.

Bakteriyel büyümenin olduğu yerlerin etrafındaki renksiz ya da açık sarı renkli bölgeler pozitif sonucu, mavi ya da mor renkli bölgeler nişasta hidrolizinin olmadığını gösterir (Lawler ve ark., 2000; Martins ve ark., 2001).

2.2.4. α -Amilaz üreticisi olarak seçilen *Bacillus* soylarının tanımlanması

Nişasta-agarda verdikleri halo çapları gözönünde bulundurularak seçilen 35 α -amilaz üreticisi *Bacillus* soyunun tanımlanması, manuel olarak gerçekleştirilen biyokimyasal testlerin yanı sıra, yarı ve tam otomatik tanımlama kitleri eliyle de yapılmıştır. Buna göre soylar öncelikle her biri standart kalınlıkta dökülmüş nutrient agar petrilere "tek koloni" halinde ekilmiş ve 35°C'ta inkübe edilmiştir. Bu işlem ardışık olarak 3-5 kez tekrarlanmış ve saflaştırma tamamlanmıştır. Saflığından emin olunan kolonilerden iki tanesi tiplendirme testlerinde kullanılmak, bir tanesi ise stok materyal olarak saklanmak üzere; 2 kez otoklav edilmiş nutrient agar eğik jelozlara ekilmiş ve 35°C'ta inkübe edilmiştir. Eğik jelozda üreme gözlemlendikten sonra 1'er tane eğik jeloz kültürü +4°C'ta saklanmış, diğerleri ise aşağıda belirtilen testlerin gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır.

2.2.4.1. Manuel olarak yapılan tanımlama testleri

Seçilen soyların ön tanımlaması, manuel olarak yapılan ve aşağıda belirtilen biyokimyasal testler ve mikroskopik inceleme ile gerçekleştirilmiştir.

1-) Mikroskopik inceleme: Bakteriyel tanımlama aşamasında nutrient agar petrilinde üretilip saflaştırılmış olan ve mikroskopik inceleme için hazırlanan bakteri hücreleri Gram boyanma, hücre çapı (0,9 μ m ölçüt alınarak), diziliş, endospor şekli, yeri ve sporangium şişkinliği özellikleri gözetilerek irdelenir.

Gram boyama: İlk kez Hans Christian Gram tarafından 19. yüzyılın ikinci yarısında tasarlanmıştır. Gram boyama, birçok bakteri türünü etkin bir şekilde 2 büyük gruba böler :

-bazik boyayı (kristal viole) emen Gram-pozitifler,

-kristal violenin alkol ya da asetonla akmasına izin veren Gram-negatifler

Bazı bakteri türleri, hücre duvarlarının kimyasal yapısından dolayı etil alkol ve aseton gibi organik renk gidericilerle muameleden sonra bile kristal violeyi tutma yeteneğindedirler. Boyayı tutan bu bakteriler mikroskop altında mor renkte görünürler ve "Gram-pozitif" olarak adlandırılırlar. Diğer bazı bakteriler ise teorilere

göre hücre duvarlarının yüksek lipid içeriğinden ya da hücre duvarı geçirgenliklerinden dolayı renk gidericiler uygulandığında kristal violeyi vererek renksizleşirler ve kontür boyama sonrası mikroskop altında pembe renkte görünerek, "Gram-negatifler" olarak adlandırılırlar.

Gram boyama yöntemi :

1-) Materyal lamin üstünde metanol veya ateş ile tespit edilir. Eğer ateş ile tespit yöntemi kullanılırsa boyamadan önce preparatın soğuması için beklenir.

2-) Lamin üzerine örneği örtecek şekilde Kristal viyole dökülerek 2 dakika beklenir.

3-) Bekleme süresi tamamlandıktan sonra boya dökülerek örnek yıkanır

4-) Örnek üzerine mordan olarak kullanılan lugol eklenir ve 1 dakika beklenir. Bu işlem iki defa tekrarlanır.

5-) Bekleme süresi sonunda lugol dökülerek örnek musluk suyu ile yıkanır.

6-) Daha sonra lam renk giderici (alkol-aseton) ile mor boya akana dek yıkanır.

7-) Renk giderme işleminden sonra preparatın üzerine kontür boya (safranin veya sulu fuksin) eklenir ve 1 dakika beklenir.

8-) Süre sonunda boya dökülerek lam musluk suyu ile yıkanır. Kurutma kağıdı ile veya havada kurutulur.

9-) Preparatın mikroskopik incelemesi X1000 büyütmede immersiyon yağı kullanılarak yapılır (Koneman ve ark., 1997; Baron ve ark., 1994).

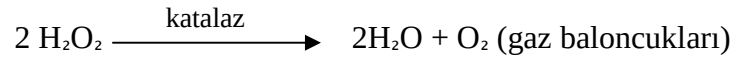
2-) Sporulasyon besi yeri: Nutrient agarda hiç spor oluşturmayan ya da sadece birkaç spor oluşturan soylar sporulasyon besi yerine aktarılarak sporlaşma sağlanabilir.

Sporulasyon besi yeri; 3 g beef ekstrakt, 5 g pepton, 15 g agar, 50 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$ (ya da 100 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ve 500 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) tartılır, distile su ile 1l'ye tamamlanır (Sneath, 1986).

3-) Koloni özelliklerinin belirlenmesi: Saf kültürlerden öze ile nutrient agar petrilere tek koloni halinde ekilen örnekler 35°C'ta 24-72 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrası koloni büyüklüğü (mm olarak), rengi, görünüşü, kıvamı ve üreme zamanı gibi özellikler tespit edilir.

4-) Katalaz testi: Katalaz, bakteriler için toksik bir metabolik ürün olan hidrojen peroksiti (H₂O₂) su ve oksijene parçalayan hemoprotein yapıda bir enzimdir.

Hidrojen peroksit, aerobik karbohidrat metabolizmasının oksidatif son ürünlerinden biri olarak oluşur. Birikmesi durumunda bakteri hücreleri için öldürücü olabilmektedir. Katalaz enzimi, hidrojen peroksitin aşağıda verilen reaksiyon ile parçalanmasını kataliz eder:



Streptococlar dışında, aerobik ve fakültatif aerobik bakterilerin çoğu katalaz aktivitesine sahiptir. Katalaz testi, *Streptococcaceae* üyelerinden *Micrococcaeae* üyelerini ya da *Clostridium* (çoğunlukla katalaz-negatif) türlerini *Bacillus* türlerinden (katalaz-pozitif) ayırmak için yaygın olarak kullanılır.

Prosedür:

Agarlı besi yerinde üremiş saf kültürden bir öze yardımcı ile bir parça örnek lamın üzerine aktarılır. Örneğin üzerine % 3 hidrojen peroksitten bir damla eklenerek baloncuk oluşumu gözlenir.

Sonuçlar: Hızla baloncuk ya da kabarcık oluşumu katalaz-pozitif sonucunu verir. Katalazın yanı sıra hidrojen peroksiti ayrıştırabilen peroksidaz gibi başka enzimler de bulunduğundan dolayı, 20-30 saniye sonra oluşan birkaç minik baloncuk pozitif sonuç olarak kabul edilmez. Çünkü katalazın hemen reaksiyon vermesine karşın, peroksidaz reaksiyonu daha uzun sürede gerçekleşmektedir. Ayrıca test kan içermeyen besi yerinden alınan örneklerle yapılmalıdır. Bunun nedeni, eritrositlerde de peroksidaz enziminin bulunmasıdır. Ancak eritrositler tarafından üretilen peroksidaz reaksiyonu gecikmeli ve zayıftır. Bunun yanı sıra eğer hiç gaz üretimi yoksa, test çikolata agarda üreyen kültürler ile tekrarlanmalıdır (Sneath, 1986; Koneman ve ark., 1997; Baron ve ark., 1994).

5-) pH 5.7' de üreme: Kapaklı tüp içindeki nutrient broth, pH 5.7 saf koloni ile ve iğne öze kullanılarak aşılır. 35°C'ta 2 haftalık inkübasyonun ardından üreme gözlemlenir (Sneath, 1986).

6-) En yüksek ve en düşük büyüme sıcaklıkları: Saf kültürden alınan örnek nutrient agar besiyerlerine ekilir. Petrilerin her biri farklı sıcaklıklarda inkübe edilmelidir. Bakterinin birbirinden 5°C farklı sıcaklıklardaki üreme yetenekleri gözlenir. İnkübasyon 55 °C ve daha üstü sıcaklıklar için 3 gün, 30-50°C için 5 gün, 20-25°C için 14 gün, 20°C'ın altındaki sıcaklıklar için ise 21 gündür (Sneath, 1986).

7-) Tuzlu besi yerinde üreme: % 0, % 5, % 7, % 10 (w/v) NaCl içeren nutrient broth tüplerine iğne öze ile küçük bir miktar saf koloni aşılır ve 35 °C 'ta inkübasyona bırakılır. Üreme 7-14 gün içinde gözlemlenir (Sneath, 1986).

8-) Sitrat kullanımı :

Sodyum sitrat bir sitrik asit tuzudur ve trikarboksilik asit döngüsünde (Krebs çemberi) bulunan basit bir organik bileşiktir. Bazı bakteriler enerjiyi karbohidrat fermantasyonundan farklı bir yolla ve sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanarak sağlarlar. Bu özelliğin tespiti bakteriyel tanımlamada sıklıkla kullanılır. Test edilen bakterilerin sitrat kullanımlarını gözlemek için kullanılan besi yerleri karbon kaynağı olarak protein ve karbohidrat içermemelidir.

Test edilen bakterinin sitrat kullanımı, sitrat besi yerinde oluşan ürünlerin ortamı alkali yapması ile tespit edilir. Besi yeri tek karbon kaynağı olarak, bir anyon olan sodyum sitratı, tek nitrojen kaynağı olarak da, amonyum fosfatı içerir. Sitratı kullanabilen bakteriler ayrıca amonyum tuzundan bir nitrojen çıkartarak (NH^+) oluşturabilirler. Bu da besi yerinin daha alkali olmasına yol açar.

Prosedür : Saf koloni öze ile sitrat besi yerinin eğik kısmına ekilir. Tüp 35°C' ta 24-48 saat inkübe edilmelidir.

Sonuçlar: Pozitif sonuç, 24-48 saatte besiyerinin renginin maviye dönüşümü ile gözlemlenir. Mavi renk oluşumu, test edilen organizmanın besiyerindeki sitratı kullanabildiğini ve alkali ürünler meydana getirdiğini gösterir. Pozitif sonuç mavi renk oluşmadan da alınabilir. Eğer inokülasyon çizgisinin üzerinde gözle görülür bir üreme varsa bu da pozitif bir sonuçtur. Çünkü üremenin görülmesi için organizma

logaritmik faza girmiş olmalıdır ki bu da sadece karbon ve nitrojen asimile edildiğinde oluşan bir durumdur. Ekim çizgisinden alınan pozitif sonuç 24 saat daha beklenerek genellikle mavi bir renk oluşumu ile doğrulanabilir (Koneman ve ark., 1997).

9-) İndol testi :

İndol, bir benzil piroldür ve triptofan amino asitinin metabolik olarak parçalanmasıyla oluşan ürünlerden biridir. Triptofanaz enzimine sahip bakteriler triptofanı hidroliz ve deamine edebilirler ve sonuçta indol, pirüvik asit ve amonyak üretirler. İndol üretimi birçok mikroorganizma türünün tanımlanmasında kullanılan önemli bir özelliktir.

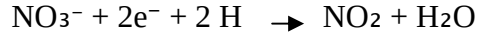
İndol testi, p-dimetilaminobenzaldehitin aldehit gurubu ile indolün reaksiyona girmesi sonucu kırmızı renkte bir kompleksin oluşumuna dayanır. Reaksiyon sonucu oluşan ürün Kovak ve Ehrlich ayıraçlarında aktif bir kimyasaldır. İndol testi için triptofanca zengin bir besi yeri kullanılmalıdır. Pratikte, sulfit –indol –hareket (SIM), hareket-indol-ornitin (MIO) ya da indol-nitrat gibi besi yeri kombinasyonları kullanılmaktadır.

Prosedür : Triptofan broth test edilecek organizma ile aşılır ve 35°C'ta 18-24 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda, tüpün iç duvarından aşağıya doğru akacak şekilde 15 damla ayıraç eklenir. Eğer Ehrlich ayıracı kullanılırsa bu basamaktan sonra 1ml ksilen eklenir. Kovac ayıracı için bu tür bir uygulama gerekli değildir.

Sonuçlar: Ayıraç eklendikten birkaç saniye sonra ayıraç ile brothun (ya da ksilen tabakanın) ara yüzeyinde parlak fuşya-kırmızı bir renk oluşumu indolün varlığını, dolayısıyla pozitif bir sonucu işaret eder (Koneman et.al., 1997).

10-) Nitrat İndirgenmesi: Nitrat bir çok bakteri ve mantar için nitrojen kaynağı olmakla birlikte parçalanması zorunlu bir maddedir. Bir organizmanın nitratı nitrite indirgeme yeteneği, tiplendirmede ve bir çok mikroorganizma gurubunda tür farklılıklarının araştırılmasında önemli bir özellik olarak kullanılır.

Nitratın kullanılmasında ilk basamak bir oksijen molekülünün çıkmasıyla nitrite indirgenme olgusudur:



Nitrat

Nitrit

Bazı bakteriler nitrati daha da ileri düzeyde indirger ve nitrojen oluşturur.

Test tüpünde nitritin varlığı alfa-naftilamin (ayıraç A) ve sülfanilik asit (ayıraç B) eklenmesi ile kırmızı renkli p-sulfabenzazo- α -naftilaminin oluşumu ile belirlenir.

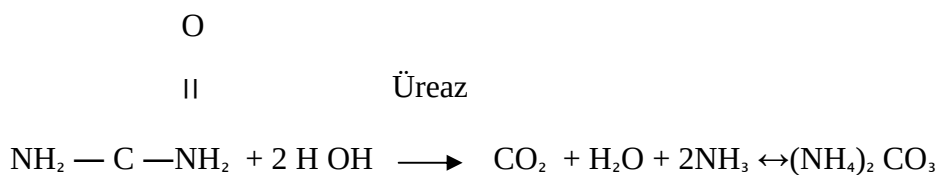
Prosedür: Test edilecek organizmanın saf kültürü ile aşılana 5ml'lik nitrat besiyeri 35°C'ta 18-24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda, besiyeri A ve B ayıraçlarının her birinden 1'er ml eklenir.

Sonuçlar: Ayıraçların eklenmesinden sonra 30 saniye içinde kırmızı renk oluşumu nitritin varlığını ve nitrat indirgenmesinin gerçekleştiğini (pozitif sonuç) gösterir. Ayıraçların eklenmesinden sonra kırmızı rengin oluşmaması, nitratın indirgenmediğini (negatif sonuç) ya da nitratın amonyak, moleküler nitrojen (denitrifikasyon), nitrit oksit (NO) ya da N₂O ve hidroksilamin gibi nitritten farklı ürünlere indirgendiğini gösterebilir. Çünkü ayıraçlar sadece nitritin varlığını gösterebilir. Bu nedenle, ikinci bir basamak uygulanır. İlk basamakta kırmızı renk oluşumu gözlenmeyen tüplere çok küçük bir miktar çinko tozu eklenir. Çinko iyonları nitratı nitrite indirger ve çinko eklenmesinden sonra kırmızı bir renk oluşumu rezidüel nitratın var olduğunu dolayısıyla negatif reaksiyonu gösterir (Koneman ve ark., 1997, Baron ve ark., 1994).

11-) Üreaz testi :

Üre, bir karbonik asit dinamididir. Bütün amidler amonyak ve CO₂ açığa çıkararak kolayca hidroliz olurlar.

Üreaz, çoğu mikroorganizma türünün sahip olduğu ve üreyi aşağıdaki reaksiyonla hidroliz eden bir enzimdir.



Amonyak solüsyonda reaksiyona girerek amonyum karbonatı oluşturur ve bunun sonucunda alkali bir ortam oluşarak besi yerinin pH'sı yükselir.

“Stuart’s üre broth” ve “Christensen’s üre agar” üreaz aktivitesinin tayini için yaygın olarak kullanılan besi yerleridir.

Sonuçlar: Üreyi hızlı parçalayan organizmalar 1 ya da 2 saat içinde pozitif sonuç verebilir. Ancak daha az aktif türler için 3 ya da daha fazla gün beklemek gerekir. Reaksiyonlar aşağıdaki gibidir :

1-) Stuart’s broth: Besi yerinin tamamında görülen pembe-kırmızı renk alkalinizasyonu ve üre hidrolizini gösterir.

2-) Christensen’s agar: *Proteus* türleri gibi hızlı üre parçalayıcılarında besi yerinin tamamı pembe-kırmızı olur. Yavaş üre parçalayıcısı *Klebsiella* türleri gibi bakterilerde, başlangıçta sadece eğik kısımda kırmızı renk görülür. Bu renk gittikçe bütün tüpe yayılır.

3-) Üre hidrolizinin olmadığı durumda besi yeri orijinal sarı rengine kalır (Koneman ve ark., 1997; Baron ve ark., 1994).

12) Voges –Proskauer (V-P) Testi: Voges – Proskauer 20. Yüzyılın başında iki biyolog tarafından geliştirilmiş bir testtir. Önce uygun kültür besi yerinin potasyum hidroksit ile muamele edilmesiyle kırmızı renk oluşumu gözlemlenmiş, daha sonra besi yerindeki aktif ürünün bakteri metabolizması tarafından oluşturulan asetil metil karbinol olduğu bulunmuştur.

Glukozun fermentasyonla parçalanması sonucu oluşan piruvik asit, bakterilerin sahip olduğu farklı enzim sistemlerine bağlı olarak çeşitli metabolik yollarla başka ürünlere dönüşür. Bunlardan birisi olan bütlen glikol yolunun son ürünü asetoin (asetil metil karbinol) dir. Atmosferik oksijen ve % 40 potasyum hidroksit (KOH) varlığında asetoin diasetile dönüşür ve alfa-naftol ile reaksiyona giren diasetil kırmızı bir kompleks oluşturur.

Prosedür: MR/VP besi yeri test edilecek organizmanın saf kültürü ile aşılansak 35°C’ta 24 saat inkübasyona bırakılır. Bu sürenin sonunda, besi yerinden 1ml alınarak, temiz bir test tüpüne aktarılır. Üzerine önce 0,6 ml α -naftol, daha sonra 0,2 ml % 40 KOH eklenir. Ayıraçların sırası çok önemlidir. Besi yerinin

atmosferik oksijenle temas etmesi için tüp hafifçe çalkalanır ve 10-15 dakika bekletilir.

Sonuçlar: Pozitif sonuç, ayıraçların eklenmesinden 15 dakika sonra oluşan kırmızı renkle alınır. Bu sonuç, asetoinin oksidasyon ürünü olan diasetilin varlığını gösterir. Test sonucuna 1saatten daha geç bakılmamalıdır. Çünkü negatif Voges – Proskauer kültürleri bu sürede bakır rengine benzer bir renk oluşturarak yanlış bir pozitif sonuç alınmasına yol açar. V-P besi yerinin pH'sı pH metre ile ayrıca ölçülür (Koneman ve ark., 1997; Baron ve ark., 1994)

13-) TSI Agar Reaksiyonları: Pratikte, fermentatif glukozu kullanabilen mikroorganizmalar, “Kligler Iron Agar (KIA)” ya da “Triple Sugar Iron (TSI)” agarda ürediklerinde gösterdikleri reaksiyonlarla tayin edilebilir. Eğer glukozu fermente etmeyen bir organizma söz konusu ise, test tüpünde herhangi bir renk değişimi gözlenmez. Bu durum, asit üretiminin olmadığını ve test organizmasının hiçbir şekeri fermente etmediğini gösterir.

KIA ile TSI agarın sukroz dışındaki tüm bileşimi aynıdır. Beef ekstrakt, yeast ekstrakt, pepton ve proteoz peptonun varlığı KIA ve TSI agarı besin yönünden çok zenginleştirmektedir. Ayrıca inhibitör de içermeyen bu besi yerlerinde bütün bakteriler ürer. Bu nedenle KIA ve TSI agar, sadece seçici agar besi yerlerinde ya da nutrient agarda üreyen tek kolonilerden örnek alınarak yapılır. Besi yerlerinde glukoz ve laktoz (TSI agarda sukroz da) eğik ve dip kısımlarda eşit dağıtılmıştır. Ancak laktoz konsantrasyonunun glukoz konsantrasyonuna oranı 10:1'dir. Bu 10:1'lik oran testin biyokimyasal ilkesinin anlaşılması için önemlidir.

Diğer yandan, demir sülfat bir hidrojen sülfid detektörüdür ve diğer demir ve demir tuzlarından daha az duyarlıdır. Bu nedenle, KIA, TSI ve diğer test besiyerleri arasında hidrojen sülfid okunması yönünden farklılık olabilir.

KIA ve TSIA bakterilerin 3 önemli özelliğini tayin etmek için kullanılır :

1-) Şekerlerin fermentasyonu ile gaz üretebilme yeteneği (Gaz oluşumu genellikle baloncuklar ya da besiyerinde oluşan çatlaklarla gözlenir).

2-) Fazla miktarda hidrojen sülfid gazı üretimi (Siyah, demir içeren bir çözelti ile gözlenir).

3-) KIA’da laktozu ya da TSIA’da laktoz ve sukrozu fermente edebilme yeteneği.

Test için hazırlanan besi yeri eğik biçimde dökülür. Bu konfigürasyon aynı tüpte iki reaksiyonun gözlemlenmesi için esastır. Eğik (slant) kısım aerobikken ‘‘butt’’ olarak adlandırılan dip (deep) kısım hava almaz ve nispeten anaerobiktir. Besi yeri hazırlanırken dip ve eğik kısımların uzunluklarının eşit olmasına (yaklaşık 3’er cm) özen gösterilmelidir.

Prosedür: KIA ve TSI tüpleri iğne öze ile ekilir. Bir agar besiyerinden alınan saf koloni öncelikle tüpün eğik kısmına ekildikten sonra iğne öze tüpün yaklaşık 3-5 cm içine daldırılarak alt kısma ekim yapılır. Tüpler 35°C’ta 18-24 saat inkübe edilir.

Sonuçlar: Test edilen organizma, eğer nonfermentatif bir bakteri ise karbohidrat fermentasyonu olmadığından asit oluşmaz ve besi yerinin rengi değişmez.

Eğer TSIA (ya da KIA) tüpü glukozu fermente eden ancak laktozu kullanamayan bir organizma ile inoküle edilir ise, besi yerinde bulunan % 0,1 konsantrasyondaki glukozdan küçük miktarda asit oluşur. İnkübasyonun ilk 8-12 . saati boyunca oluşan küçük miktardaki asit bile eğik ve dip kısmın başlangıçta sarı renge dönüşmesini sağlar. Daha sonraki birkaç saat içinde glukoz tamamen tükenir ve bakteriler oksijenin var olduğu eğik kısımda amino asitlerin oksidatif fermentasyonuna başlar. Aminlerin salınımı ve bunların eğik kısımda bulunan az miktardaki asitin yerine geçmesi ile 18-24 saatte eğik kısmın pH’ sı alkali olmaya başlar ve rengi tekrar kırmızıya döner. Tüpün dip kısmında ise (nispeten anaerobik kısım) amin oluşumu asit oluşumunun yerine geçemediğinden bu kısım sarı renkli kalır. Böyle bir ‘‘alkali eğik -asit dip’’ reaksiyonu bu organizmanın laktozu fermente etmediğini gösterir.

Eğer tüp laktoz fermente eden bir organizma ile ekilmiş ise, glukoz ilk 8-12 saate tamamen kullanılsa bile fermentasyon, organizma laktozu kullanabildiği için devam eder. Bu yüzden 18-24 saatin sonunda ve sonrasında eğik ve dip kısımlar sarı renkte görülür. ‘‘Asit eğik-asit dip’’reaksiyonu elde edilmiş olur. Kesin sonuç için 7-14 gün beklemek yararlıdır.

Renksiz olan hidrojen sülfidin belirlenmesi için besi yeri bir indikatör içermelidir. Sodyum tiyosülfat bir çok besi yerinde hidrojen sülfid üretimi için sülfür atomu kaynağı olarak kullanılır. Besi yerindeki demir tuzları hidrojen sülfid ile reaksiyona girerek suda çözülmeyen siyah bir çökelti oluşturur.

Reaksiyonların özeti :

- Alkali eğik/Alkali dip (K/K) → Karbohidrat fermentasyonu yok. Nonfermentatiflerin özelliği.

Örnek : *Pseudomonas aeruginosa*.

- Alkali eğik/Asit dip (K/A) → Glukoz fermente edilmiş, laktoz (ve sukroz) fermentasyona uğramamış. Laktoz fermente etmeyen bakterilerin özelliği.

Örnek : *Shigella*

- Alkali eğik/Asit, siyah dip (K/A/H₂S) → Glukoz fermente edilmiş, laktoz fermente edilmemiş, hidrojen sülfid üretilmiş. Laktozu fermente etmeyen ve hidrojen sülfid oluşturan bakterilerin özelliği.

Örnek: *Salmonella*, *Citrobacter*, *Proteus*

- Asit eğik/Asit dip (A/A) → Glukoz, laktoz (ve sukroz) fermente edilmiş,

Örnek: *E. coli*, *Enterobacter* (Sneath, 1986; Koneman ve ark., 1997; Baron ve ark., 1994).

14-) Jelatinin sıvılaşması: Ticari olarak satın alınan nutrient jelatin besi yeri ya da sadece jelatin içeren test tüpleri (120 g jelatin ve 1000 ml distile su, pH 7.0) ile alternatif olarak % 0.4 jelatin eklenmiş nutrient agar mikroorganizmaların jelatinaz aktivitelerinin tayininde kullanılabilir.

Test edilecek bakterinin saf kültüründen, katı haldeki (+4°C'ta saklanan) jelatin tüplerine iğne öze ile ve içine batırılarak ekim yapılır. İnkübasyon 28-35°C'ta gerçekleştirilir. İnkübasyonun 24. saatinde ve takip eden her 24 saatlik süresinin sonunda sıvı haldeki besi yeri 20°C ve altındaki sıcaklıklarda 3-4 saat bekletilir. Eğer mikroorganizma jelatinaz enzimine sahipse besi yerini katılaştıran jelatini

parçalar ve bu sıcaklıklarda besi yeri sıvı halde kalır. Eğer katı halde kalırsa 28-35°C'taki inkübasyona devam edilir ve 4 hafta süreyle gözlemlenir (Sneath, 1986).

15-) Hareket: Bakterilerin hareketli olup olmadığını gözlemlemek için bakteriler SIM (sülfür indol motiliti) ya da MIO (motiliti indol ornitin) yarı-katı besi yerine iğne öze ile dibine kadar batırılarak inoküle edilir. 24-72 saatlik inkübasyon sonunda üreme sadece öze batırılan bölgede ise sonuç negatif, üreme inokülasyon yapılan bölgenin çevresinde de görülüyor ise pozitifdir (Sneath, 1986).

16-) Penisilin Testi: Bakteriler, penisiline dirençli olup olmadıklarını belirlemek üzere saf kültürlerden alınarak, nutrient agar besi yerine öze ile yayılır. İnokülasyon bölgesinin ortasına 10 U penisilin diski yerleştirilerek 37 °C' ta 24 saat inkübasyona bırakılır. İnokülasyon süresi sonunda penisilin disklerinin çevresinde üreme gözlenmesi penisiline direnci, disk çevresinde üreme olmayan zonların belirmesi ise penisilin duyarlılığını göstermektedir.

17-) Anaerop Üreme: Anaerop üremenin belirlenmesi için saf kültürlerden öze ile inoküle edilmiş nutrient agar petrilere "Anaerop Poşet Sistemi" ne yerleştirilerek 37 °C' ta 72 saat inkübasyona bırakılır. İnokülasyon sonrasında üreme gösteren soylar anaerop ortamda üreyebilme yeteneğindedir.

18-) Kanlı agarda hemoliz: Birçok bakterinin kanlı agardaki koloni morfolojisi ve hemoliz özelliği bakteriyel tanımlamada yaygın olarak kullanılır. Kanlı agar besi yeri içeriğinde; 10 g pepton, 5 g beef ekstrakt, 5 g NaCl, 15 g agar, 1000 ml distile su bulunmaktadır. Besi yeri pH' sı 7.4' e ayarlanır. Karıştırılıp ısıtılan besi yeri 121°C' ta 20 dakika steril edilir. Steril petrilere 0,5'er ml koyun kanı bir pipet yardımı ile koyulur. Steril edildikten sonra 50°C'a kadar soğutulmuş besi yerinden her bir petri kutusuna 15' er ml dökülerek, hiç beklemeden besi yeri ile kanın karışması sağlanır. Bu işlem sırasında besi yerinin 50°C' a soğutulmuş olması kanın hemoliz olmaması açısından önemlidir. Karıştırma işleminin hızlı yapılması gerekmektedir. Böylelikle besi yerinin donarak kanla iyice karışmayan pıhtılar şekline dönüşmesi ve ekime uygun olmayan bir şekil alması önlenmiş olur.

Testin ilkesi: Bazı bakteriler kan hücrelerine etkili hücre dışı enzimler üretir ve kan hücrelerini tamamen lizise uğratabilir (β hemoliz) ya da koloninin etrafında yeşil bir renk oluşturabilir (α ya da tamamlanmamış hemoliz). Bazıları ise hiçbir etki

göstermezler (gama olarak adlandırılabilirler).

Sonuçlar:

α hemoliz: Koloninin etrafında kısmi renk açılması ve besi yerinin yeşil renge dönüşümü.

β hemoliz: Eritrositlerin lizisinden dolayı koloninin etrafındaki kanın tamamen açılmasıyla oluşan açık renkli zon.

α prime: Koloninin etrafında bitmemiş bir lizisin halosu ile onun çevresinde tamamen hemoliz olmuş ikinci bir zon bulunması.

Bakteriler tarafından hemolizinlerin üretimi inkübasyon ortamına, pH' sına ve birçok değişik faktöre bağlıdır. Kanlı agarda morfoloji ve hemoliz, bir izolatin tanımlanmasında daha ileri basamaklara yardımcı olabilecek özelliklerdir. Kanlı agardaki hemolitik reaksiyonların gözlenmesi için petri ışığa tutularak bakılır (Koneman ve ark., 1997; Baron ve ark.,1994).

2.2.4.2. Yarı otomatik ve tam otomatik tanımlama sistemleri

Bacillus cinsi soyların tanımlanması; manuel testlerin yanı sıra *Bacillus* cinsi üyelerinin tanımlanmasında kullanılan API 50 CHB/E kiti ile API 20E kiti ve tam otomatik bir tanımlama sistemi olan VITEK cihazı kullanılarak da yapılmıştır. Kitler ve VITEK sistemi BİOMERIEUX Firmasından sağlanmıştır.

2.2.5. Bakterilerin uzun süreli stok kültürlerinin hazırlanması

Tanımlanan soyların uzun süreli stok kültürlerinin hazırlanması için eğik jelozda bulunan örnekler 2 ml LB besi yerine steril kürdan ile aşlanarak 37°C'ta 170 rpm çalkalama hızında gece boyu inkübe edilmiştir. Elde edilen kültürlerin 375 µl'si (-20)°C stokları için 625 µl % 80 gliserol içeren steril Eppendorf tüpüne ve 625 µl'si (-80)°C stokları için 375 µl % 80 gliserol içeren steril Eppendorf tüpüne eklenmiş ve tüpler iyice karıştırıldıktan sonra -20 ve -80°C derin donduruculara yerleştirilmiştir.

LB Broth Besi Yeri: 10 g nutrient broth, 5 g yeast ekstrakt, 8 g NaCl, 0,52 g Tris. Distile su ile 1 litreye tamamlanır. 121 °C' ta 40 dakika otoklav edilir.

2.2.6. α -Amilaz Aktivite Testi

Enzim: Hücre kültürü 10000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen üst sıvı enzim kaynağı olarak kullanılır.

Tampon: Aktivite testinde 6,7 mM NaCl içeren 20 mM NaH₂PO₄ tamponu (pH 6,9) kullanılır. 0.5 M Na₂HPO₄ ve 0.5 M NaH₂PO₄ hazırlanarak pH’ları ölçülür. Bu çözeltilerden hareketle 20 mM M Na₂HPO₄ ve 20 mM NaH₂PO₄ hazırlanır. Bu iki çözelti pH 6.9 olacak şekilde birbiri ile karıştırılır. Son konsantrasyonu 6.7 mM olacak şekilde 5 M NaCl eklenir.

Substrat çözeltisi:

6,7 mM NaCl içeren 20 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 6,9) % 1 çözünür nişasta çözeltisi hazırlanır.

Dinitro salisilik asit çözeltisi:

10 g 3,5 dinitro salisilik asit tartılır ve 500 ml distile su ile karıştırılır. Üstüne 200 ml NaOH (2M) eklenerek karıştırıldıktan sonra yavaş yavaş 300 g sodyum potasyum tartarat eklenir. Dinitro salisilik asitin çözünmesi zor olduğu için 1 gece manyetik karıştırıcıda bırakılarak karıştırılır. Tamamen çözündüğünde distile su ile 1litreye tamamlanır.

Protokol: 500 μ l hücre üst sıvısı alınarak, üzerine 500 μ l substrat çözeltisi eklenir. Vorteks ile hafifçe karıştırılan tüpler 37° C su banyosunda 3 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sonrası her bir tüpe 3 ml 3-5 dinitro salisilik asit çözeltisi eklenerek vorteks ile karıştırılır. Tüpler daha sonra 10 dakika kaynayan su içinde tutulur. Oda sıcaklığına gelinceye dek buza alınan tüplere 8 ml distile su eklenerek vorteks ile karıştırılır. A540 nm’de spektroskopik ölçümleri yapılır.

α -Amilaz için:

1U: 37° C’ta pH 6,9’da 1 dakikada 1 μ mol maltoz açığa çıkaran enzim miktarıdır.

Kalibrasyon eğrisi: 6,7 mM NaCl içeren 20 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 6,9) çözünmüş maltoz (5 μ mol/ml) standart olarak kullanılır. Maltozun seri dilüsyonları Tablo 2.2’de verildiği şekilde hazırlanır.

Tablo 2.2. Maltoz Kalibrasyon Eğrisi Değerleri.

	0 (blank)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5 µmol/ml maltoz	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
dH ₂ O (ml)	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	-

Her tüpe 3 ml 3-5 dinitro salisilik asit solüsyonu eklenerek vorteks ile karıştırılır. Tüpler kaynar suyun içinde 10 dakika süreyle kaynatılır. Oda sıcaklığına gelinceye dek buzda soğutulan tüplere daha sonra 8 ml distile su eklenerek karıştırılır. A540 nm’de spektrofotometrik ölçümleri yapılan örneklerin iki seti için elde edilen değerlerin ortalaması alınarak, maltoz konsantrasyonuna karşı 540 nm’deki absorbans grafiği çizilir. Hazırlanan grafikten elde edilen eğim enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılır.

$$\text{Enzim Aktivitesi} = \frac{\frac{A_{540}}{\text{Eğim}} \times \frac{1000}{MA_{\text{Maltoz}}} \times \text{Reaksiyon Hacmi (ml)}}{\text{Enzim Hacmi (ml)} \times \text{Reaksiyon Süresi (dakika)}}$$

Reaksiyon Hacmi: 1 ml

Enzim Hacmi: 0,5 ml

Reaksiyon Süresi: 3 dakika

M.A (maltoz) : 360,3 g/mol

Eğim: 0,153

2.2.7. Yerel soylarda α-amilaz aktivitesinin belirlenmesi

2 ml LB, ilgili bakterinin -20°C’ta korunan stok kültürünün 20 µl’si ile aşıl原因arak 37°C’ta 170 rpm’de 1 gece inkübe edildikten sonra 10ml’lik kapaklı kültür tüpünde bulunan 3 ml LB besi yerinin aşıl原因masında kullanılmıştır. 37°C’ta 170 rpm’de gerçekleştirilen inkübasyonun farklı saatlerinde örnek alınarak α-amilaz aktivitelerine bakıldı. Örnekler kültürün 8.,9.,10.,13.,20.,24.,30.,48.,54. saatlerinde alındı.

Tüpte yapılan çalışmalar sonucunda α -amilaz aktivitesi en iyi olan 5 soy belirlenerek, 72 saatlik bir inkübasyon çalışmasına alındı. 1 gecelik ön kültürden 500 μ l örnek ile aşılardan 50 ml LB besi yeri 250 ml'lik erlen içinde, 37°C'ta 170 rpm'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ilk 48 saati boyunca 4, 48-72. saatler arasında 6 saatlik aralıklarla alınan örneklerde hücre yoğunluğu ve enzim aktivitesi belirlendi.

2.2.8. % 1 Nişasta içeren M-9 besi yerinde α -amilaz aktivitesinin belirlenmesi

LB besi yerinde büyütülen kültürlerden alınan aktivite sonuçlarının iyi olmaması nedeniyle bakterilerin, primer izolasyonda kullanılan ve α -amilaz enziminin substratı olan nişastayı içeren M-9 besi yerinde büyütülmesi kararlaştırıldı. 35 soyun 4 ml M-9 besi yerinde hazırlanan paralel kültürlerinde aktivite testleri yapıldı.

2.2.9. % 1 Nişasta içeren M-9 besi yerinde gerçekleştirilen erlen çalışması

İzole edildiği kaynak ve tüpte yapılan aktivite çalışmalarının sonuçları göz önüne alınarak erlen çalışmasına alınacak soylar A3, A4, A7, A18, A23, A26, A28, P19, P22 olarak belirlendi. Çalışma 250 ml'lik erlenlerde gerçekleştirildi ve daha önceki sonuçlar göz önünde bulundurularak erlen hacminin 1/3'ü kadar besi yeri kullanıldı. % 1 nişasta içeren 83 ml M-9 besi yeri 2 ml LB besi yerinde büyütülmüş ön kültürün 830 μ l'si ile aşılandı. İnkübasyon 37°C'ta 170 rpm'de yapıldı ve çalışmanın ilk 56 saati boyunca 4 saatte bir ve 56. saatten sonra yalnızca 74.,120.,144. ve 168. saatlerde örnek alınarak, enzim aktivitesi ve hücre yoğunluğu tayini yapıldı. Aktivite değeri 168. saatin sonunda da yüksek olan A3 soyu için 192., 216. ve 288. saatlerdeki aktivite ve hücre yoğunluğu değerleri belirlendi.

2.2.10. % 1 Nişasta içeren alkali M-9 besi yerinde (pH 9.3) gerçekleştirilen erlen çalışması

pH 10 nişasta agar petrilerinde verdikleri halolar değerlendirilerek seçilen A4, P22 ve A26 soylarının alkali ortamdaki enzimatik aktivitelerini belirlemek üzere öncelikle M-9 besi yerinin pH'sı % 10 Na₂CO₃ ile 9.3'e yükseltildi. Seçilen 3 soyun alkali ortamdaki ilk testleri 3 ml M-9 besi yeri içeren kültür tüplerinde

yapıldı. İnkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde alınan örneklerle yapılan testler sonucunda A4 ve A22 soylarının çalışmaya alınmasına karar verildi.

A4 ve P22 soylarının alkali M-9 besi yerinde 72 saat süren inkübasyonunda inkübasyon koşulları ve çalışma düzeni bir önceki çalışma ile aynı tutuldu.

2.2.11. Kültür üst sıvısı ile gerçekleştirilen enzim ön nitelendirme çalışmaları

Gerek enzimatik aktivite, gerekse örnek kaynağının özellikleri, primer izolasyon koşulları ve tiplendirme çalışmaları sonuçlarına dayanılarak, en ilgi çekici soy olduğu düşünülen A28 soyunun ürettiği α -amilaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi kararlaştırıldı. Bu amaçla A28 soyunun en üretken olduğu inkübasyon saatlerini doğrulamak üzere yeni bir çalışma başlatıldı. Bir önceki erlen çalışmasında bu soyun enzimatik açıdan en üretken olduğu saatin, kültürün 17. saati olduğu göz önünde bulundurularak yeni kültürün 17., 20., 24., 28., 30. ve 41. saatlerinde hücre yoğunluğu ve α -amilaz aktivitesi belirlendi. Yeni kültür çalışması önceki çalışmayla aynı koşullarda gerçekleştirildi (% 1 nişasta içeren M-9 besi yeri, -20°C stoklarından hazırlanan ön kültür, % 1'lik aşılama oranı, 1/3 havanlandırma oranı, 45°C inkübasyon sıcaklığı, 170 rpm çalkalama hızı). Çalışma sonucunda enzimatik aktivitenin en yüksek değerine kültürün 17. saatinde ulaştığı doğrulandı. Buradan yola çıkılarak üst sıvısından ön nitelendirme yapılacak yeni bir kültür aynı koşullar sağlanarak başlatıldı ve inkübasyonun 17. saatinde kültürün tamamı santrifüj tüplerine alınarak Beckman Santrifüj'de 7000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Üst sıvının tamamı aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere ayrıldı.

Ön Nitelendirme Çalışmaları:

- 1) Optimal reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi:** Kültür üst sıvısı ie aktivite testleri farklı sıcaklıklarda gerçekleştirildi. Buna göre enzimatik aktivitenin ilk basamağı olan 37°C'ta 3 dakika inkübasyon basamağındaki sıcaklık değeri her defasında değiştirildi ve inkübasyon süresi sabit tutuldu. Optimal reaksiyon sıcaklığı çalışmaları 15, 25, 37, 45, 55, 65, 75 ve 85°C'ta gerçekleştirildi.
- 2) Sıcaklık kararlılığının belirlenmesi:** Kültür üst sıvısının belirlenen farklı sıcaklıklarda 15 dakika bekletilmesinin ardından enzimatik aktivite genel protokole uygun olarak belirlendi. Sıcaklık kararlılığı, optimal reaksiyon

sıcaklığının belirlenmesi sırasında uygulanan sıcaklıklar kullanılarak gerçekleştirildi.

3) Optimal reaksiyon pH'sının belirlenmesi: Farklı pH'lardaki tamponlarda çözölmüş nişasta, genel protokoldeki substrat çözeltisi olarak kullanıldı. Buna göre nişasta, pH 5 - 9.0 aralığı için 100 mM potasyum fosfat tamponu ile ve pH 10.0- 11.0 aralığı için 100 mM glisin tamponu ile çözölerek kullanıldı.

4) pH kararlılığının belirlenmesi: Enzimatik aktivite reaksiyonları, üst sıvının ilgili pH'lardaki tamponlarda 1/5 oranında seyreltilerek, gece boyu +4°C'ta bekletilmesinin ardından gerçekleştirildi. pH kararlılık çalışmalarında kullanılan tamponlar optimal reaksiyon pH'sının belirlenmesi çalışmalarında kullanılanların aynısıdır.

Ön nitelendirme çalışmalarının tamamı paralel 2 set kullanılarak yapıldı.

Sıcaklık kararlılığı çalışmalarının sonuçlarından yola çıkılarak A28 soyunun üst sıvısı ile 85°C'ta 2 deney daha gerçekleştirildi. Bu çalışmaların ilkinde üst sıvı ilgili sıcaklıkta 45 dakika, diğerinde ise yine 85°C'ta 17,5 saat bekletildikten sonra aktivite çalışmalarına alındı. Deneyler 2 paralel set halinde gerçekleştirildi.

2.2.12. SDS-PAGE ve zimogram analizi

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE), polipeptitlerin elektriksel alanda moleköler ağırlıklarına bağılı olarak farklı hızlarda göç etmeleri temeline dayanmaktadır. Molekül ağırlığı bilinmeyen proteinler, moleköl ağırlığı bilinen standart proteinlerle (belirteç/işaret proteinleri) birlikte yürütölerek, jelde oluşın bantlar karşılaştırılır ve bilinmeyen proteinin moleköl ağırlığı hakkında bir fikir edinilebilir.

α -Amilaz zimogram analizinde, denatüran içermeyen jelde aktivite gösteren bantların belirlenmesi hedeflendi.

2.2.12.1. SDS-PAGE için örneklerin hazırlanması

SDS-PAGE için, kültür üst sıvısından 30 μ l alınarak üzerine 10 μ l yükleme tamponu eklendi. Standart olarak seçilmiş protein belirtecinden 5 μ l alınarak üzerine 20 μ l yükleme tamponu eklendi. Hazırlanan örnekler karıştırıldıktan sonra kısaca santriföl edildi. 5 dakika süreyle kaynayan suda bekletilen örnekler jele yüklendi.

Kültür üst sıvısının konsantre edilmesi amacıyla aseton çöktürmesi yapıldı. Bunun için kültür üst sıvısından 120 µl alınarak bir Eppendorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 1 ml soğuk aseton eklendi. 4 paralel set halinde hazırlanan örnekler karıştırıldıktan sonra buz içinde 30 dakika bekletildi. Süre bitiminde 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve oluşan üst sıvılar atıldı. Çökelek liyofilizatörde 20-25 dakika kurutulduktan sonra distile su ile çözüldü. Çalışılan tüplerden 2 tanesindeki çökelekler 15’şer µl distile su ile, diğer iki çökelek ise birleştirilerek, toplam 15 µl distile su ile çözüldü. Tüplere 7 µl yükleme tamponu eklendi. Standart olarak seçilmiş protein belirtecinden 5 µl alınarak üzerine 20 µl yükleme tamponu eklendi. Örnekler karıştırıldı ve jele yüklenmeden önce 5 dakika kaynatıldı.

Yükleme Tamponu:

50 mM Tris-HCl, pH 6.8,
 % 1 SDS,
 2 mM EDTA,
 % 1 β-merkaptoetanol,
 % 10 gliserol,
 % 0,002 Bromofenol blue.

2.2.12.2. SDS-PAGE’de kullanılan jellerin hazırlanması ve örneklerin yüklenmesi

Ayrırma jeli:

750 µl dH₂O
 3750 µl 0,75 M Tris HCl, pH 8.8 / % 0.2 SDS
 3 ml Akrilamit/ Bisakrilamit (30:1)
 90 µl %10 APS
 6 µl TEMED

Derişim jeli:

1050 µl dH₂O
 1500 µl 0,25 M Tris HCl, pH 6.8 / % 0.2 SDS
 390 µl Akrilamit / Bisakrilamit (30:1)
 60 µl % 10 APS
 3 µl TEMED

Jel dökme aparatları hazırlandıktan sonra önce ayırma jeli bir pipet yardımı ile dökülür. Üzeri hemen izopropanol ile kaplanır. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra üst fazdaki izopropanol dökülür ve jelin üstü distile su ile birkaç kez yıkanır. Yıkama işleminin ardından ayırma jelinin üzerine derişim jeli dökülür ve hemen taraklar yerleştirilir. Derişim jelinin polimerizasyonunun ardından taraklar dikkatle çıkarılarak oluşan kuyular 1X SDS- PAGE yürütme tamponu ile yıkanır. Bu aşamada hazırlanan örnekler pipet yardımı ile kuyulara yüklenir ve aparat SDS- PAGE tankına yerleştirilir. Tank 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile doldurulur. Elektroforez, bantlar alt jele (ayırma jeli) geçene dek 100 Volt'ta, daha sonra 200 Volt'ta gerçekleştirilir. Elektroforez tamamlandığında çıkarılan jel boyama çözeltisinde gece boyu hafifçe çalkalanarak bekletilir. Distile su ile yıkandıktan sonra arındırma çözeltisinde bekletilir.

Boyama çözeltisi:

100 ml % 10 asetik asit

100 ml % 95'lik alkolde çözölmüş % 0,25 Coomassie Blue

Arıtma çözeltisi:

% 5 asetik asit

% 50 etanol

5XSDS-PAGE yürütme tamponu:

15 g Tris

72 g glisin

5 g SDS tartılarak distile su ile 1 litreye tamamlanır.

2.2.12.3. Zimogram analizi için örneklerin hazırlanması

A28 soyunun kültür üst sıvısının zimogram analizi için öncelikle 20 µl üst sıvı, üzerine 20 µl yükleme tamponu eklenerek, oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Süre sona erdiğinde örnekler jele yüklendi.

2.2.12.4. Zimogram analizinde kullanılan jeller ve örneklerin yüklenmesi

Yükleme Tamponu:

0,125 M Tris-HCl, pH 6,8

% 20 Gliserol

% 0,04 SDS

% 0,005 Bromophenol Blue

Geliştirme çözeltisi:

6,7 mM NaCl içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu, pH 6.9

Zimogram analizinde jellerin hazırlanması ve dökülmesi aşamaları yukarıda anlatılan SDS-PAGE ile aynıdır. Farklı olarak zimogram analizinde ayırma jeli % 0.2 oranında çözünür nişasta içerek şekilde hazırlanmıştır. Örneklerin kuyulara yüklenmesinin ardından elektroforez, derişim jelinde 80 V'ta ve boya jelden çıkana kadar ayırma jelinde 120 V'ta gerçekleştirildi. Özgün olmayan nişasta hidrolizinden ve rezolüsyon kaybından kaçınmak için elektroforez 4°C'ta gerçekleştirildi. Elektroforez tamamlandığında jel distile su ile yıkandıktan sonra geliştirme çözeltisi içinde, 39 °C'ta 2,5 saat hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası jel, % 12 TCA çözeltisinde 10 dakika bekletildi ve en son aşama olarak lugol ile boyandı. Zimogram analizi, Martinez ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntem (Martinez ve ark., 1997) modifiye edilerek yapıldı.

2.2.13. Moleküler tiplendirme çalışmaları

2.2.13.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için seçilen A28 soyunun -20 °C stoklarından 50 ml LB içine % 1 oranında aşılama yapıldı ve gece boyu 45°C'ta, 170 rpm'de inkübasyonun ardından elde edilen kültürün tamamı steril Eppendorf tüplerine eşit oranda dağıtılarak aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- Tüpler 7000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Üst sıvılar çökeltilere dokunulmaksızın uzaklaştırılır.
- Her bir Eppendorf tüpüne; 567 µl TE, pH7.5 eklenerek pipetle karıştırılır. Ardından 30 µl % 10 SDS eklenerek karıştırılır. Her tüpe 3 µl Proteinaz K (20 mg/ml) eklenir.
- 37°C'ta 1 saat süreyle su banyosunda bekletilir ve kısa süreyle santrifüj edilir.
- Üzerlerine 100 µl 5 M NaCl eklenerek karıştırılır.
- 80 µl CTAB+NaCl (% 10 heksadesiltrimetil amonyum bromid + 0,2 M NaCl) eklenerek karıştırılır.
- 65°C su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakılır.

- Süre dolunca üzerlerine 750-800 µl kloroform/izoamil alkol (24/1) eklenerek karıştırılır.
- 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı yeni bir Eppendorf tüpüne aktarılır.
- 700 µl fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1) eklenerek karıştırılır.
- 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı yeni bir Eppendorf tüpüne aktarılır.
- 340 µl soğuk izopropanol eklenen tüpler DNA iplikleri görününceye değin karıştırılır.
- 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildikten sonra tüplerde oluşan üst sıvı atılır.
- Çökelek 100 µl % 70 soğuk etanol eklenerek yıkanır.
- 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilir ve üst sıvı atılır.
- Çökelek liyofilize edilir.
- Kurutulan örnekler 30 µl steril dH₂O ile eklenerek çözülür ve bir soya ait bütün tüplerdeki DNA çözeltileri tek bir tüpte (ana tüp) toplanır. Kalan tüplerden ilki 50 µl steril dH₂O ile yıkanır ve toplanan sıvı ikinci tüpe aktarılır. Bu yıkama işleminin tüm tüplerde yapılmasının ardından toplanan sıvı ana tüpe aktarılır.
- Elde edilen genomik DNA’nın konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle belirlenir. Bu amaçla DNA çözeltisi uygun oranda dH₂O ile seyreltilerek 220, 230, 240, 250, 255, 260, 270, 280, 290, 300, 320 nm dalga boyunda absorbans ölçülür.
- «Genomik DNA’nın konsantrasyonu (µg/ml)= 260 nm’deki OD x 50 x sulandırma oranı» formülü kullanılarak konsantrasyon hesaplanır.

Hazırlanan DNA çözeltileri -20 °C’ta saklanır.

Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler:

TE (Tris-EDTA), pH7.5

10 mM Tris-HCl, pH 7.5

0,1 mM EDTA,

121°C’ta 40 dakika otoklav edilir.

% 10 SDS çözeltisi

10 g SDS, distile su içerisinde çözülerek 100 ml'ye tamamlanır. 121°C'ta 40 dakika otoklav edilir.

5 M NaCl

29,2 g NaCl tartılarak dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır. 121°C'ta 40 dakika otoklav edilir.

% 10 CTAB (setiltrimetil amonyum bromid) + 0,2 M NaCl

10 g CTAB tartılır, üzerine 80 ml dH₂O, 4 ml 5 M NaCl eklenerek karıştırılır. Karıştırma işlemi manyetik karıştırıcıda uzun süreli yapılabildiği gibi, 65 °C'lık su banyosunda ısıtılarak daha kısa sürede yapılabilir. Tamamen çözüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. 121 °C'ta 40 dakika otoklav edilir.

Kloroform/İzoamil alkol çözeltisi (24:1)

240 ml kloroform 10 ml izoamil alkol ile karıştırılarak 250 ml kloroform/ izoamil alkol çözeltisi elde edilir.

Doyurulmuş fenol çözeltisi

250 ml fenol, 250 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0, 25 gr 8-Hidroksikinolin (final konsantrasyonu % 0,1 olacak şekilde) karıştırılır. Alüminyum folyo ile sarılır ve oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda düşük hızda 10 dakika karıştırılır. Üst faz ayrılınca atılır ve aynı işleme çözeltinin pH'sı 8 oluncaya kadar devam edilir. pH ayarlandığında 0,5 ml β-merkaptoetanol (% 0,2) eklenir. Üst faz atılır ancak fenolün hava ile etkileşmemesi için bir miktarı bırakılır. Işık görmeyecek şişelerde +4 °C'ta saklanır.

Fenol/Kloroform/İzoamil alkol çözeltisi (25:24:1)

250 ml doyurulmuş fenol, 250 ml kloroform/izoamil alkol (24:1) ile karıştırılarak 500 ml'lik fenol/kloroform/izoamil alkol çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan çözelti 0,1 M Tris-HCl eklenerek hava ile doğrudan temas etmekten korunur ve ışık görmeyecek şişelerde 4°C'ta saklanır.

% 70 etil alkol çözeltisi

70 ml etil alkol 30 ml distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak karıştırılır. Genomik DNA izolasyonunda kullanılacak etanol solüsyonunun -20°C'ta saklanması gerekmektedir.

2.2.13.2. 16S rRNA genlerinin PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltılması

In vitro koşullarda istenilen bir genin ya da özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesi için kullanılan bir yöntem olan PCR, 1985 yılında geliştirilmiştir. Bu yöntem eliyle özgün bir DNA parçasının çok sayıda kopyası primerler tarafından yönlendirilen reaksiyonlarla enzimatik olarak sentezlenir. Cetus firması araştırmacılarının geliştirdiği yöntem, klonlama, dizi analizi, yönlendirilmiş mutagenез, DNA haritalama gibi moleküler biyolojik çalışmaların yanı sıra bugün birçok hastalığın tanısında da kullanılmaktadır.

PCR, çift iplikli bir DNA molekülünde bulunan hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve enzimatik yöntemle uzatılması temeline dayanmaktadır. Kalıp DNA molekülünün yüksek sıcaklıkta (92-95°C) denatüre edilmesinin ardından oluşan tek iplikli DNA moleküllerindeki hedef dizilere tamamlayıcı diziler taşıyan oligonükleotid primerler bağlanır (tutunma/annealing basamağı). Bu tutunma düşük sıcaklık derecelerinde (45-55 °C) gerçekleşmektedir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon varlığında primerin 3'-OH ucuna deoksiribonükleozid monofosfatları ekleyerek uzamasını sağlar (uzama/extension basamağı). Bu amaçla reaksiyon ortamına yapı taşı olarak dNTP'ler konulur. Bu basamak için uygun sıcaklık 72°C'tır. Böylece kalıp DNA'nın her ipliğine tamamlayıcı yeni bir DNA molekülünün sentezlenmesi gerçekleşir. Bu 3 aşama bir PCR döngüsünü oluşturmaktadır. Verimli bir PCR 25-35 döngüden oluşmaktadır. Tekrarlanan döngülerle birlikte sentezlenen DNA parçalarının sayısı logaritmik olarak artmaktadır.

PCR bileşenleri

- **Kalıp DNA:** Genomik DNA, plazmit ve faj DNA'sı, çeşitli genler veya DNA parçaları kalıp olarak kullanılabilir.
- **Polimeraz:** Günümüzde sıcaklık kararlılığı yüksek polimeraz enzimleri tercih edilmektedir. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılanı *Thermus*

aquaticus'tan elde edilen *Taq* DNA polimerazdır. Bunun dışında çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen Amplitaq, Hot Tub, Pyrotase, Tth, Pfu, Vent gibi enzimler de kullanılmaktadır.

- **Primerler:** Primerler, kalıp DNA'ya tamamlayıcı nitelikte, genel olarak 20-30 nükleotit uzunluğunda oligonükleotitlerdir. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA parçasının iki ucunda bulunan ve dizisi bilinen bölgeler göz önünde bulundurulur. Tasarım aşamasında dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardan biri; dört bazın yaklaşık eşit sayıda kullanımıdır. Bunun yanında, primerlerin polipürin, poliprimidin ya da tekrarlanan bölgeler içermemesi, primer çiftlerinin 3' uçlarının birbirine ya da primer içindeki herhangi bir bölgeye tamamlayıcı olmaması gerekmektedir.
- **dNTP karışımı:** Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır.
- **Tamponlar ve MgCl₂:** PCR'da kullanılan tamponlar arasında en yaygın olanı *Taq*/Amplitaq enzimlerine özgü olanıdır. MgCl₂ ise içerisinde bulunan Mg⁺² iyonlarının dNTP'ler ile çözülebilir kompleksler oluşturması, çift iplikli DNA'nın T_m değerini arttırması, kalıp/primer etkileşimi ve polimeraz enzimi üzerindeki uyarıcı etkisinden dolayı PCR'da uygun konsantrasyonda kullanımına dikkat edilmesi gereken bir bileşendir.

A28 soyunun 16S rDNA'sının PCR ile çoğaltılması çalışmaları

Primerler:

İleri primer: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', T_m= 58°C

Ters primer: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3', T_m= 54°C

Reaksiyon koşulları:

	Final miktar
Genomik DNA	100 ng
İleri primer	6,25 μ mol
Geri primer	6,25 μ mol
dNTP	0,2 mM
10 $\times$ PCR tamponu	1 $\times$
<i>Taq</i> polimeraz	0,9 U
dH ₂ O (ampul)	
Toplam Hacim	25 μ l

I. PCR protokolü:

- 94 °C' ta 4 dakika ön denatürasyon
 - 94 °C' ta 1 dakika denatürleme
 - 49 °C' ta 1 dakika tutunma
 - 72 °C' ta 2 dakika uzama
 - 72 °C' ta 5 dakika tamamlanma
- X35

PCR çalışması, Biometra T3 termal döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirildi ve elde edilen PCR ürünleri % 1 agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Bu çalışmada 1.5, 3.0, 4.0, 5.0 mM MgCl₂ konsantrasyonları denendi.

II. PCR protokolü:

- 94 °C' ta 4 dakika ön denatürasyon
 - 94 °C' ta 1 dakika denatürleme
 - 51 °C' ta 1 dakika tutunma
 - 72 °C' ta 2 dakika uzama
 - 72 °C' ta 5 dakika tamamlanma
- X35

II. PCR çalışmasında, I. çalışmada oluşan ve özgün olmayan bantların sentezini engellemek amacıyla tutunma sıcaklığı 51 °C'a yükseltildi. Ayrıca I. çalışmanın agaroz jel sonuçları gözetilerek 1.5, 3.0, ve 4.0 mM MgCl₂ konsantrasyonları kullanıldı. Elde edilen PCR ürünleri % 1 agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

2.2.13.3. A28 soyunun 16S rDNA dizi analizi çalışmaları

A28 soyunun tür isminin daha net belirlenmesi amacıyla 16S rDNA dizi analizi çalışması planlandı. DNA dizi analizi için kullanılan 2 temel yöntem bulunmaktadır. Her 2 yöntemde de rezolüsyonu yüksek denatürleyici poliakrilamit jeller kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden ilki olan kimyasal yöntem (Maxam-Gilbert Yöntemi), radyoaktif işaretli bir DNA molekülünün bazlara özgü kimyasalların etkisiyle parçalanması, oluşan çeşitli boyuttaki parçaların poliakrilamit jelde yürütülmesi ve otoradyografi filmiyle görüntülenerek, dizinin okunması temeline dayanır. Tez çalışması kapsamında kullanılan ikinci yöntem ise enzimatik ya da dideoksi zincir sonlandırma yöntemi (Sanger Yöntemi) olarak adlandırılır. Sentez tek iplikli bir DNA kalıbına tamamlayıcı oligonükleotid primer ile birisi radyoaktif işaretli 4 deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında DNA polimerazın uzama reaksiyonu yapması ile gerçekleştirilir. Ortamda ayrıca şekerlerindeki 2' ve 3' karbonlarında hidroksil grubu bulundurmeyen dideoksiribonükleozid trifosfatlar (ddNTP) da bulunmaktadır. Hücredeki normal bir replikasyon aşamasında yeni eklenen nükleotidin 5' fosfor atomu, zincirin ucundaki son nükleotidin şekerinin 3' hidroksil grubuyla fosfodiester bağı oluşturur. Sanger dizi analizinin temeli, dideoksinükleozit monofosfatların uzayan zincirin ucunda bulunmaları halinde (3' hidroksil grubu taşımadıklarından) sentezi o aşamada durdurmaları ilkesine dayanmaktadır. Bunun sonucu olarak da çeşitli boyutlarda DNA zincirleri oluşur. Oluşan DNA iplikleri denatürleyici poliakrilamit jel elektroforezi ile ayrılır ve jel otoradyografi filmi ile görüntülenebilir. Otoradyogramdaki bantlar incelenerek dizi belirlenir (Frederick, 1993).

Dizi analizi jelinin hazırlanması:

10 M üre:

180,18 g üre tartılarak üzerine 100 ml distile su eklenir, manyetik karıştırıcıda ısıtılarak ve karıştırılarak çözülür. Çözünmenin ardından distile su ile 300 ml'ye tamamlanır. Üzerine 30 g mixed bed rezin eklenir ve 1 gece karıştırılarak deiyonize edilir. Son aşamada filtre kağıdı ile süzülür.

Formamid boya:

100 ml formamid, 5 g rezin ile karıştırılarak 30 dakika deiyonize edilir. Süre sonunda filtre kağıdından süzülerek üzerine 30 mg bromophenol blue ve 30 mg ksilen siyanol ile 4 ml EDTA (0,5 M) eklenir. -20 ve -80 °C'ta stoklanır.

10X TBE (Tris Borat EDTA), pH 8,3:

121,1 g tris baz, 61,83 g borik asit tartılır. Üzerine 40 ml EDTA (0,5 M) eklenir ve karıştırılır. Distile su ile 1 litreye tamamlanır.

Poliakrilamit jel:

18 g akrilamit, 0,6 g bisakrilamit tartılır. Üzerine 7,5 ml distile su ve 30 ml 10X TBE eklenir, karıştırılır. Akrilamit çözündükten sonra 82,5 ml 10 M üre eklenir. Distile su ile 300 ml' ye tamamlanır ve 3MM Whatman kağıdından süzülerek koyu renkli bir şişeye aktarılır. Jel bu haliyle +4 °C' ta saklanabilir. Jel döküleceği zaman kullanım miktarı (~ 100 ml) ayrılarak içerdiği havadan arındırılır. Jel dökülmeden hemen önce 875 µl % 10 APS eklenir ve hafifçe karıştırılır. Son aşamada 75 µl TEMED eklenir, karıştırılır ve jel beklemeden dökülür. Taraklar yerleştirilir. Yatay konumda polimerize olan jel kullanılabildiği +4 °C'ta saklanır. Dizi analizinden önce kuyulara önce yalnızca formamid boya konularak, 1500 Volt'ta 30 dakika süreyle ön elektroforez yapılır.

Kalıp DNA'nın hazırlanması:

Dizi analizi için kalıp DNA'nın hazırlanmasında alkali denatürleme yöntemi kullanıldı. A28 soyunun 16S rDNA PCR ürününden 6 µl alınarak üzerine 44 µl distile su, 5 µl 2 M NaOH-2 mM EDTA eklenerek karıştırıldı. 37 °C su banyosunda 30 dakika tutulduktan sonra kısa süreyle santrifüj edildi ve üzerine 5,5 µl 3 M sodyum asetat, 125 µl absöü etanol eklendi. Vorteksle karıştırılarak -20 °C ta 1 gece bekletildi. Ertesi gün tüp 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek, üst sıvı çekildi. Çökelti liyofilizatörde 20-25 dakika kurutuldu ve 7 µl distile su ile çözüldü.

Dizi analizinde kullanılan primer:

5'-TAC GGG AGG CAG CAG T-3'

Kontrol DNA:

M13 DNA' sı dizi analizi çalışmasında kontrol DNA olarak kullanıldı. M13, tek iplikli, 7.3 kb büyüklüğünde dairesel DNA'ya sahip bir bakteriyofajdır.

Dizi analizi protokolü:

1) Tutunma reaksiyonu:

A28 için:

Kalıp DNA (~0,5 pmol)	7 µl
Sekuanaz reaksiyon tamponu (5X)	2 µl
Primer (2 pmol/µl)	1 µl

M13 için:

M13 tek iplikli DNA (0,2 µg/µl)	5 µl
Evrensel ileri primer (0,5 pmol/µl)	2 µl
Sekuanazreaksiyon tamponu (5X)	2 µl
Distile su	1 µl

Hazırlanan A28 ve M13 tüpleri 65 °C su banyosunda 2 dakika inkübe edildikten sonra soğuması için 65°C su dolu bir beherin içinde oda sıcaklığında karıştırılarak bekletildi. Tüplerin içinde bulunduğu suyun sıcaklığı 35°C'a ulaştığında beher +4 °C'ta sıcaklık 18 °C'a düşünceye dek beklendi. Kısa süreli santrifüj işleminin ardından işaretleme reaksiyonlarına başlandı.

2) İşaretleme reaksiyonu:

DTT (0,1 M)	1 µl
İşaretleme karışımı (1X)	2 µl
[α - ³⁵ S] dATP (1000 Ci/mmol)	0,5 µl
1/8 seyreltilmiş sekuanaz	2 µl

Tutunma gerçekleştikten sonra 18 °C'ta bekleyen A28 ve M13 tüplerine yukarıda reaktifler belirtilen sırayla eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra kısaca santrifüj edildi ve 18 °C'ta 4 dakika bekletildi.

3) Terminasyon reaksiyonları:

Terminasyon karışımları:

1) ddG terminasyon karışımı: 80 μ M dGTP, 80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dTTP, 8 μ M ddGTP, 50 mM NaCl

2) ddA terminasyon karışımı: 80 μ M dGTP, 80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dTTP, 8 μ M ddATP, 50 mM NaCl

3) ddC terminasyon karışımı: 80 μ M dGTP, 80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dTTP, 8 μ M ddCTP, 50 mM NaCl

4) ddT terminasyon karışımı: 80 μ M dGTP, 80 μ M dATP, 80 μ M dCTP, 80 μ M dTTP, 8 μ M ddTTP, 50 mM NaCl

Terminasyon reaksiyonları küçük bir “micro titre plate” de gerçekleştirildi. Kuyulara sırasıyla A, C, G, T olarak isim verildi. Her bir kuyuya ilgili terminasyon karışımından 2,5 μ l koyuldu. Ön ısıtma için 37°C su banyosunda kısa bir süre bekletilen sonlandırma karışımlarına işaretleme reaksiyonu tamamlanmış örneklerden 3,5 μ l eklendi. 37°C su banyosunda 15 dakika inkübasyonun ardından kuyulara 4'er μ l durdurma solüsyonu eklendi. 86°C'ta 3 dakika bekletildi. Örnekler daha sonra sırasıyla yüklendi ve poliakrilamit jelde 1800V'da 1 saat 45 dakika yürütüldü.

Elektroforez tamamlandığında jel 3MM Whatman kağıdının üzerine aktarılacak 5 dakika % 10 asetik asitle muamele edildi. Jel distile su ile yıkandı ve 80°C'ta 90 dakika kurutuldu. Jel otoradyografi yöntemi ile görüntülendi.

2.2.14. A28 soyu kültür üst sıvısı ile yapılan ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography, TLC)

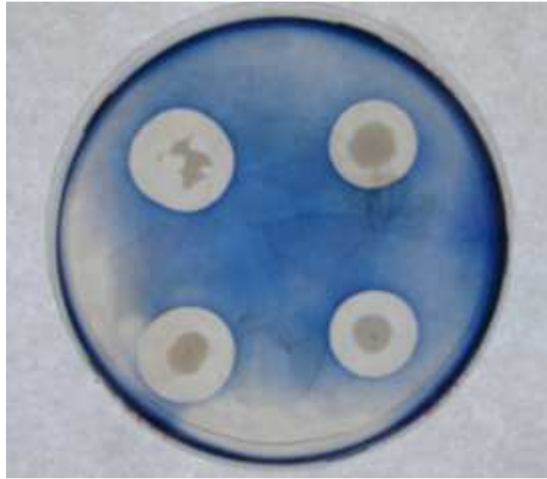
A28 soyu kültür üst sıvısından 1 ml alınarak üzerine 1 ml substrat çözeltisi (sodyum fosfat tamponunda çözünmüş % 1 nişasta) eklendi ve vorteksle karıştırıldı. 55°C su banyosunda yapılan inkübasyonun 3. ve 30. dakikalarında örnek alındı. Alınan örnekler TLC öncesinde 100°C'a kadar ısıtıldıktan sonra, 20°C'ta ~15 dakika bekletildi. Daha sonra örnekler silika jel ile kaplı TLC plakasındaki işaretli noktalara Hamilton enjektörü ile damlatıldı. TLC plakasına ayrıca, substrat çözeltisi ve

belirteç olarak kullanılan glukoz, maltoz ve malto dekstrin örnekleri damlatıldı. Plaka kurutulduktan sonra içinde çözücü (% 85 asetronitril, % 15 distile su) bulunan cam kaba bir ucundan batırıldı ve çözücü plakanın tümünü kaplayana değin bekletildi. Kurutulan plaka timol ile yıkandı ve “thermoplate” de yakıldı.

3. BULGULAR

3.1. Primer İzolasyon Sonucu Elde Edilen Soylar ve α -Amilaz Üreticilerinin Tanımlanması

Tez çalışmasının bu bölümünde yerel ekosistemlerden toplanan su ve toprak örnekleri ile pirina, karasu, tereyağı örneklerine uygulanan primer izolasyon sonucu elde edilen ve 292'si topraktan gelen toplam 598 izolat, α -amilaz üretkenliklerinin belirlenmesi için işlevsel teste alındı. α -Amilaz üreticisi soyların seçici besi yerinde oluşturduğu zonların görünümü Şekil 3.1'de örneklenmiştir. İşlevsel testler sonucunda izolatların birçoğunun α -amilaz üretici olduğu görüldü ve bu soylardan 35 tanesi seçici besi yerinde verdikleri halo çapları göz önüne alınarak, ön tiplendirme çalışmaları için seçildi.



Şekil 3.1. α -Amilaz üreticisi soyların nişasta-agarda lugol uygulaması sonrası verdikleri şeffaf zonların görünümü.

Seçilen 35 adet α -amilaz üreticisi soyun “Bergey’s Manuel of Systematic Bacteriology”ye göre yapılan ve manuel olarak uygulanan ön tiplendirme çalışmaları sonucu benzerlik gösterdiği en yakın *Bacillus* türü ya da türleri belirlendi, ancak bazı soyların yapılan testler çerçevesinde hiçbir *Bacillus* türüne benzemediği gözlemlendiğinden bu soylar “?” ile belirtildi. 35 soyun benzeştiği tür(lerin) adı, primer izolasyonun yapıldığı besi yerinin özellikleri, örneğin alındığı yerel kaynak tipi ve özellikleri ile izolatların seçici besi yerinde oluşturduğu zon çapı Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Seçilen soyların kaynakları, izolasyon koşulları, alfa amilaz üretkenlikleri ve benzeştikleri tür isimleri.

Örnek Kodu	Örnek Kaynağının Yeri ve Özellikleri				Primer İzolasyon				Seçici Besi Yeriindeki Zon Çapı (mm)		Manuel testlere göre soyların benzeştiği tür(lerin) adları
	Örnek Kaynağı	Tipi	pH	Sıcaklık (°C)	Pastörizasyon	Besi yeri	pH	Sıcaklık (°C)	pH 7	pH 10	
A1	Gönen Dağ Ilıcısı-1	kaplıca suyu	7	43	-	NA	7	30	11	0	<i>B.megaterium</i>
A2	Gönen Dağ Ilıcısı-1	kaplıca suyu	7	43	-	NB	7	30	12	0	<i>B. subtilis</i>
A3	Gönen Dağ Ilıcısı-1	kaplıca suyu	7	43	+	NB	7	55	12	0	<i>B subtilis</i>
A4	Gönen Dağ Ilıcısı-1	kaplıca suyu	7	43	-	NB	10	30	11	0	?
A5	Gönen Dağ Ilıcısı-1	kaplıca suyu	7	43	+	NB	10	30	10	0	?/B.polymxa
A6	Gönen Dağ Ilıcısı-2	kaplıca suyu	7,5	43	-	NA	7	30	10	0	?
A7	Afyon Heybeli Kaplıcası	toprak	9	48	+	LA	7	30	11	6	?
A8	Afyon Heybeli Kaplıcası	toprak	9	48	+	LA	7	30	11	6	<i>B. subtilis</i>
A9	Afyon Heybeli Kaplıcası	toprak	9	48	+	LA	10	30	12	9	<i>B. subtilis</i>
A10	Edremit Zeytin İşletmeleri	karasu	5		-	NA	7	30	11	0	<i>B. circulans</i>
A11	Afyon Gazlıgöl	kaplıca suyu		29	-	NB	10	30	11	13	<i>B. brevis</i>
A12	Afyon Heybeli Kaplıcası	toprak	9	48	+	LA	10	30	10	11	<i>B. megaterium</i>
A13	Afyon İkbal Tesisleri	kaplıca suyu	7	43	-	NA	7	30	3	15	?
A14	Afyon Gecek Kaplıcası	toprak		26	+	LA	7	30	10	10	? / <i>B. firmus</i>
A15	Afyon Gecek Kaplıcası	toprak		26	+	LA	10	30	12	17	? / <i>B. firmus</i>
A16	Afyon Gecek Kaplıcası	toprak	8	48	+	LA	7	30	11	14	? / <i>B. firmus</i>
A17	Afyon Gecek Kaplıcası	toprak	8	48	+	LA	10	30	11	16	<i>B. subtilis</i>
A18	Edremit Zeytin İşletmeleri	pirina			+	NA	7	30	11	6	<i>B. subtilis</i>
A19	Edremit Zeytin İşletmeleri	pirina			+	NA	7	30	11	6	?
A20	Edremit Zeytin İşletmeleri	pirina			-	NA	7	55	16	yok	<i>B. subtilis</i>
A21	Gönen Dağ Ilıcısı	toprak		35	+	LA	7	30	15	11	?
A22	Gönen Dağ Ilıcısı	toprak		35	+	LA	7	30	10	12	? / <i>B. firmus</i>
A23	Bursa Karamustafa Kaplıcası	kaplıca suyu	7,2	63	-	AA	7	70	14	yok	<i>B. subtilis</i>
A24	Yalova mantar çiftliği	torf	6,5		+	LA	7	30	11	15	<i>B. subtilis</i>

A25	Afyon İkbāl Tesisleri	kaplıca suyu	7	43	-	AA	7	70	10	yok	<i>B. stearothermophilus</i>
A26	Manyas Serpin Kaplıcası	kaplıca suyu	7	53	-	AA	7	70	6	16	<i>B. stearothermophilus</i>
A27	Yalova mantar çiftliği	torf	6,5		+	LA	10	30	10	7	?
A28	Afyon Heybeli Kaplıcası	kaplıca suyu	8	53	-	AA	7	45	10	yok	<i>B. subtilis</i> / <i>B. licheniformis</i>
A29	Afyon Ömerli Kaplıcası	toprak	-	15	-	LA	10	30	0	14	<i>B. alcalophilus</i>
P17	Afyon Heybeli Kaplıcası	kaplıca suyu	8	58	-	AL	10	30	14	16	?
P18	Afyon Çay Kaplıcası	kaplıca suyu	7	38	-	TSB	7	45	16	24	<i>B. firmus</i>
P19	Gönen Yıldız Otel G-7	kaplıca suyu	7,2	58	-	MN	7	45	12	0	<i>B. licheniformis</i>
P21	Afyon Ömerli Kaplıcası	toprak	-	80	+	LA	10	55	0	9	<i>B. licheniformis</i>
P22	Gönen Dağ Ilıcası	toprak	-	35	+	LA	10	30	9	11	<i>B. megaterium</i>
P23	Yalova mantar çiftliği	sarılmış kompost	7,5	-	+	LA	10	55	7	12	<i>B. licheniformis</i>

35 α -amilaz üreticisi soy arasından enzimatik aktiviteleri ve alındıkları kaynağın özellikleri göz önünde tutularak seçilen 9 tanesi, daha ileri tiplendirme çalışmalarına alınmış, bu amaçla API50CHB/E, API20E kitleri ile VITEK tanımlama sistemi kullanılmıştır. API50CHB/E ve API20E kitleri, VITEK sistemi ve tekrarlanan manuel testlerle yapılan tanımlanmalar sonucu elde edilen tür isimleri Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. α -Amilaz üreticisi soyların manuel testler, API kitleri ve VITEK sistemi ile yapılan tanımlama sonuçlarına göre benzeştikleri tür(lerin) adları.

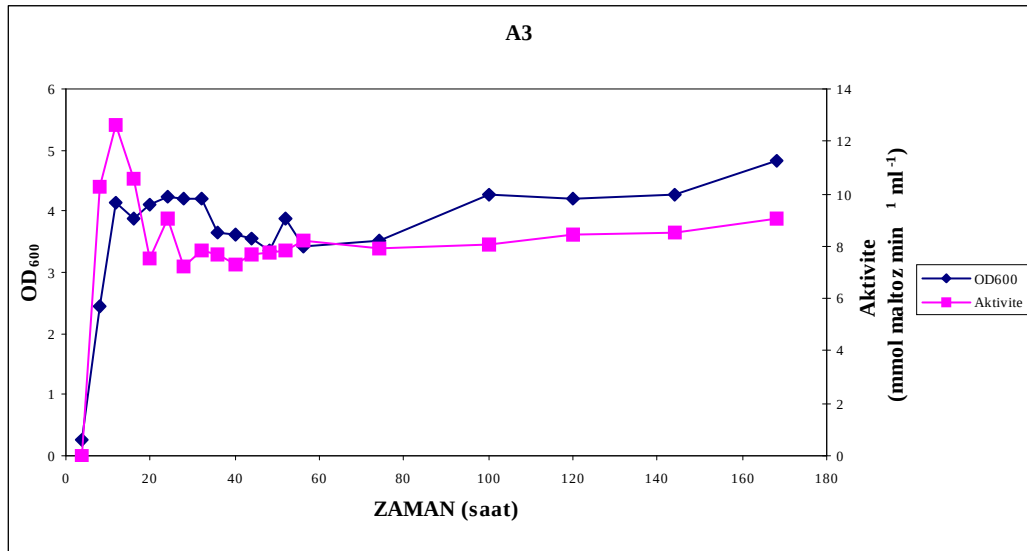
	Olası Tür Adı			ÖNERİLEN TÜR ADI
	Manuel testler	API kitleri	VITEK sistemi	
A3	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>
A4	?	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>
A7	?	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>
A18	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis (amyloliquefaciens)</i>
A23	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis (amyloliquefaciens)</i>
A26	<i>B. stearothermophilus</i>	(unacceptable)	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>
A28	<i>B. subtilis / B. licheniformis</i>	(unacceptable)	<i>B. licheniformis (Questionable biopattern)</i>	<i>B. licheniformis (Q.Biopattern)</i>
P19	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis/B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis/ B. subtilis</i>
P22	<i>B. megaterium</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>

3.2. α -Amilaz Üreticisi Soylarda Hücre Büyümesi ve Enzimatik Aktivite

Seçilen soylarla 37°C'ta, 170 rpm çalkalama hızında, LB besi yerinde büyütülen kültürlerde yapılan aktivite çalışmaları sonucunda, α -amilaz üretiminin istenen düzeyde olmadığı belirlendi. Buna karşın havalandırma derecesinin 1/5'ten 1/3'e düşürülmesinin enzim aktiviteyi olumlu yönde etkilediği gözlemlendi.

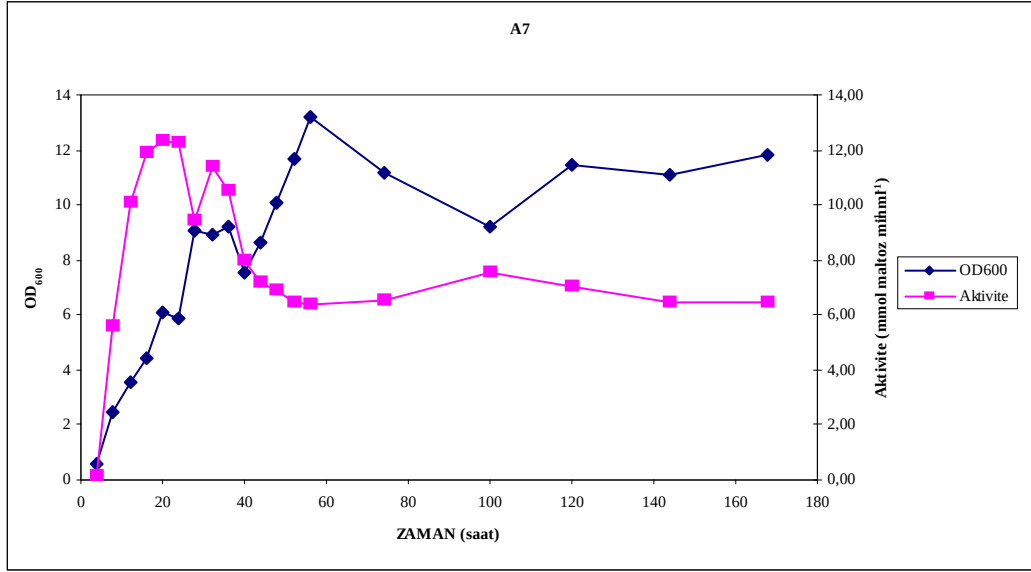
Alternatif besi yerlerinin denenmesi kararlaştırıldı ve α -amilaz substratı olan nişastayı % 1 oranında içeren M-9 besi yerinde yapılan aktivite çalışmalarında enzim üretiminin uyarıldığı gözlemlendi.

Seçilen 9 *Bacillus* soyunun hücre büyüme eğrileri ve enzim aktivite değerleri Şekil 3.2-3.12'de verilmiştir:



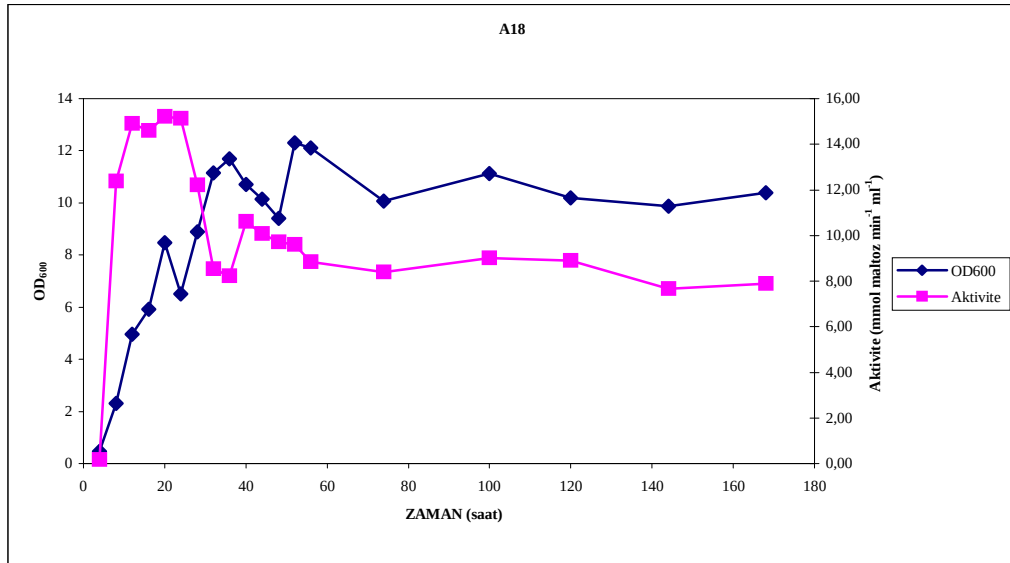
Şekil 3.2. A3 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi.

Buna göre, A3 soyunda enzim aktivitenin genel anlamda hücre büyümesine paralel bir seyir gösterdiği, en yüksek değerine kültürün 12. saatinde ulaştığı, 20. saatte bu değer yarısına inerek, daha sonra uzun süre aynı değerde kaldığı gözlemlendi.

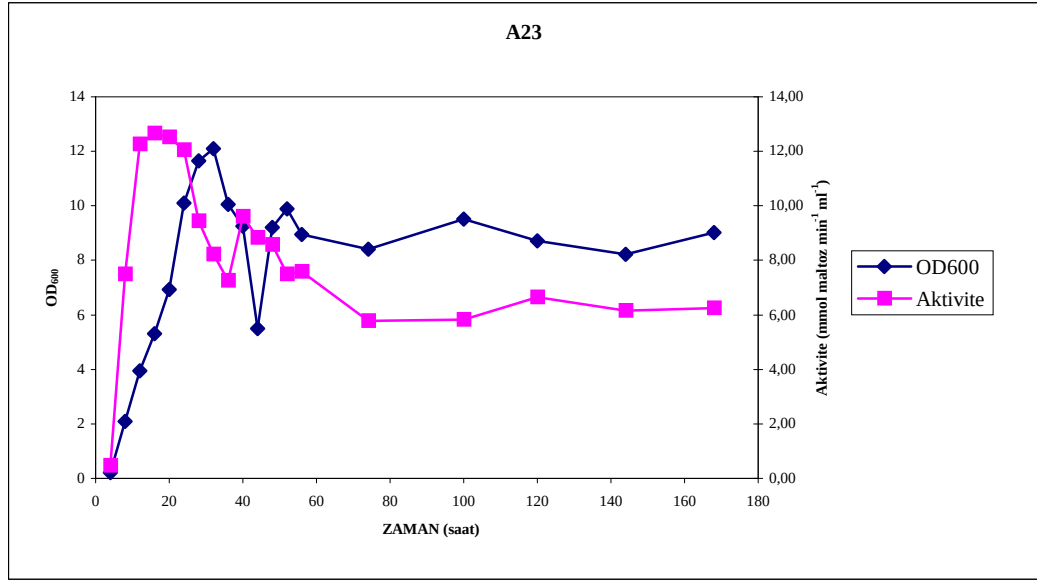


Şekil 3.3. A7 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi.

A7 soyunda enzimatik aktivitenin 20. saatte en yüksek değerine ulaştığı, daha sonra artan hücre yoğunluğuna rağmen aktivitenin yarı değerine düştüğü ve aynı düzeyde kaldığı gözlemlendi.

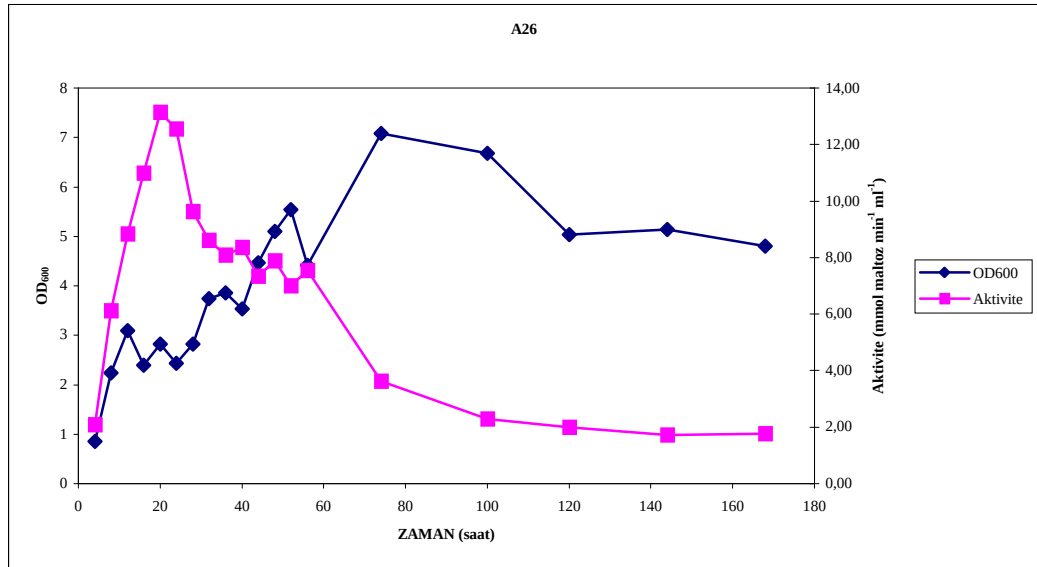


Şekil 3.4. A18 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi.

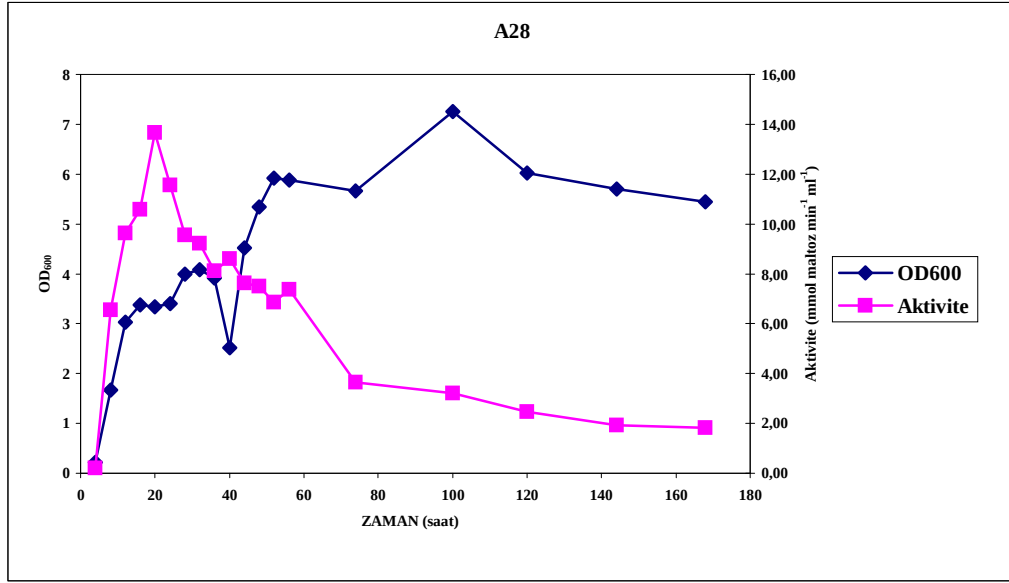


Şekil 3.5. A23 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi.

A18 ve A23 soylarında benzer bir aktivite profili gözlemlendi. Her iki soyda da yaklaşık 20. saatte en yüksek aktivite değeri alındı ve kültürün 32-36. saatlerinde bu değer yarıya düştü. Aktivite kültürün ilerleyen saatlerinde yaklaşık aynı değerde kaldı.

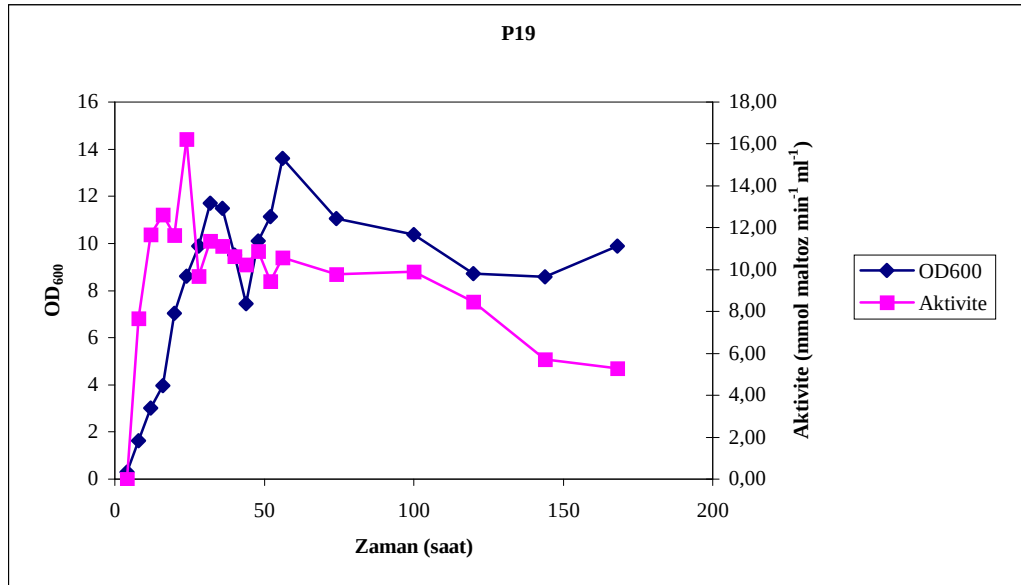


Şekil 3.6. A26 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi.



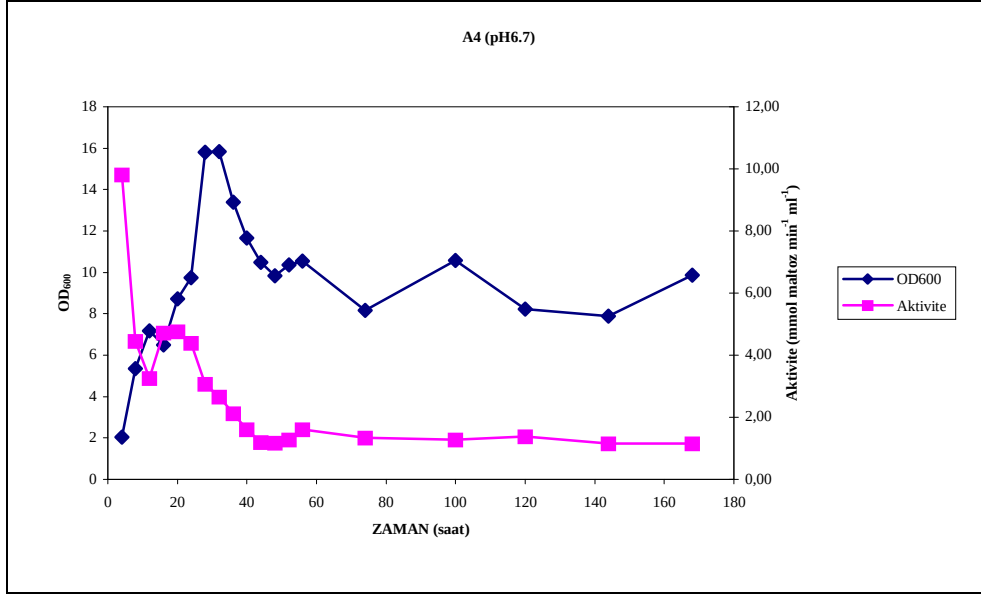
Şekil 3.7. A28 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi.

A26 ve A28 soylarında en yüksek aktivite değeri yine 20. saatte alındı. Enzimatik aktivite bu soyların her ikisinde de 52. saatte en yüksek aktivitenin yarı değerine düştü.

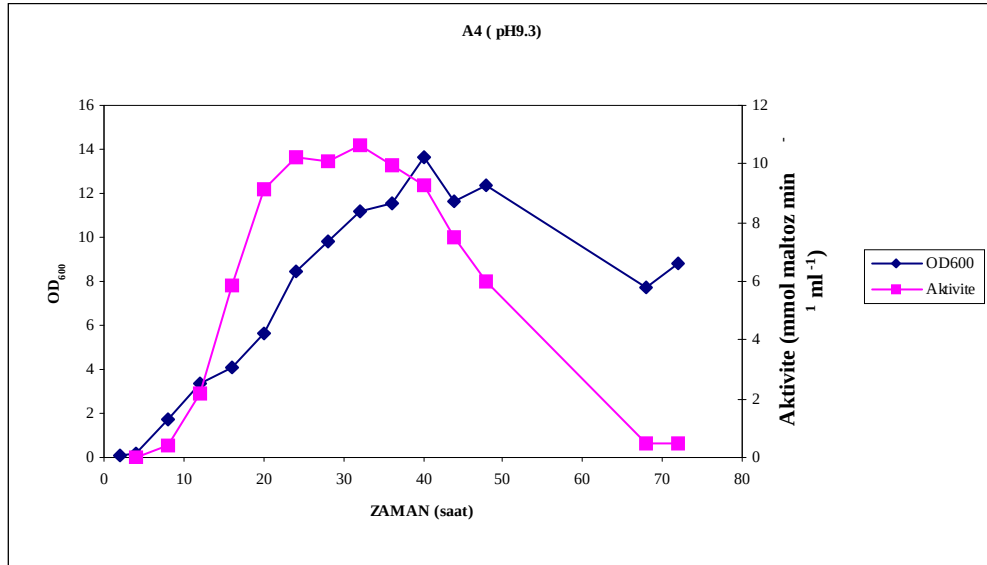


Şekil 3.8. P19 soyunda hücre büyümesi ve enzim aktivitesi.

P19 soyunda enzimatik aktivite en yüksek değerine 24. saatte ulaştı. Kültürün 35. saatine kadar yaklaşık bu değerde kalan aktivite 40. saatten itibaren azaldı.

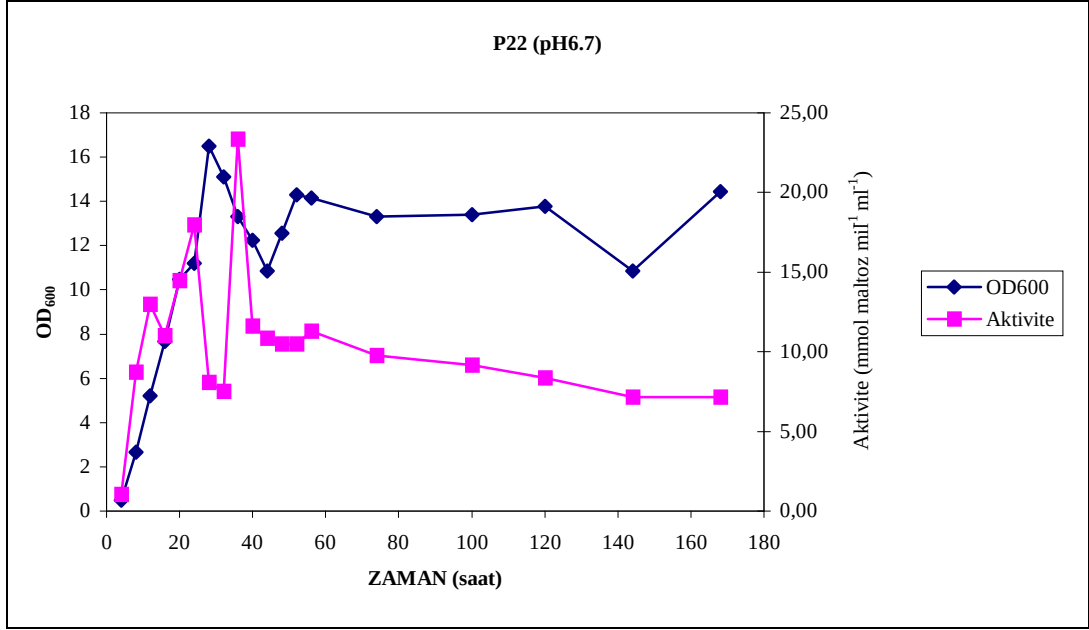


Şekil 3.9. A4 soyunun M-9 (pH6.7) besi yerinde hücre büyümesi ve enzim aktivitesi.

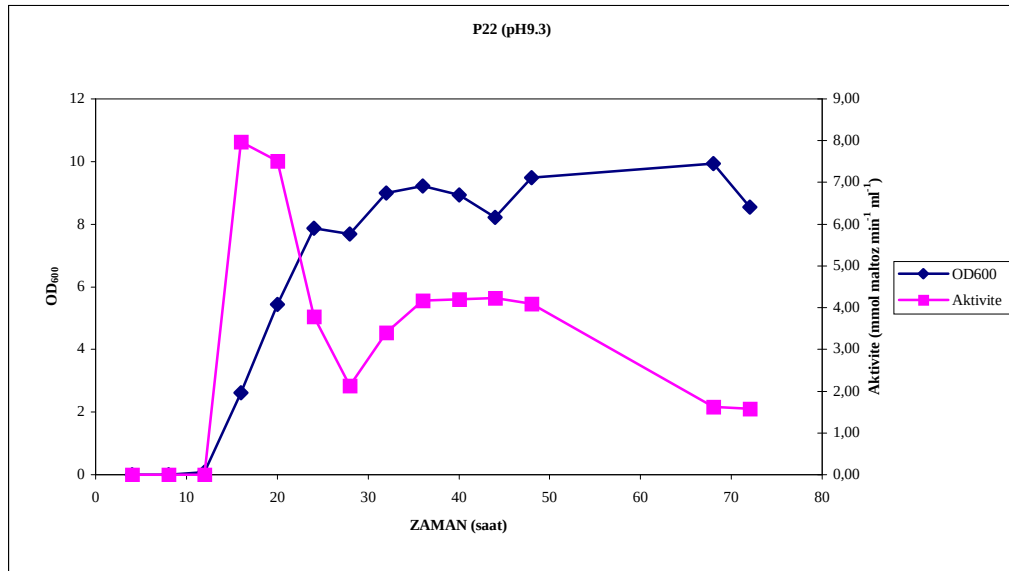


Şekil 3.10. A4 soyunun alkali M-9 besi yerinde hücre büyümesi ve enzim aktivitesi.

% 1 nişasta içeren M-9 besi yerinde (pH 6.7) büyütülen A4 soyu için enzimatik aktivite kültürün 4. saatinde bir pik verdikten sonra hızla düştü. Besi yeri pH'sının 9.3'e yükseltildiği çalışmada ise en yüksek değerine 32. saatte erişen aktivite, hücre yoğunluğuna paralel şekilde seyretti ve ve kültürün 70. saatinde hemen tamamen kaybedildi.



Şekil 3.11. P22 soyunun M-9 (pH6.7) besi yerinde hücre büyümesi ve enzim aktivitesi.

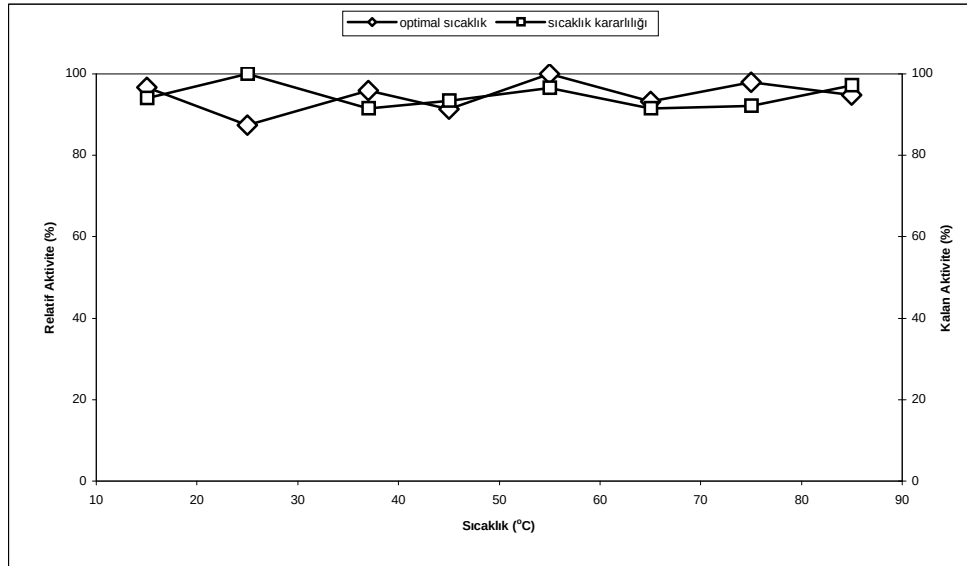


Şekil 3.12. P22 soyunun alkali M-9 besi yerinde hücre büyümesi ve enzim aktivitesi.

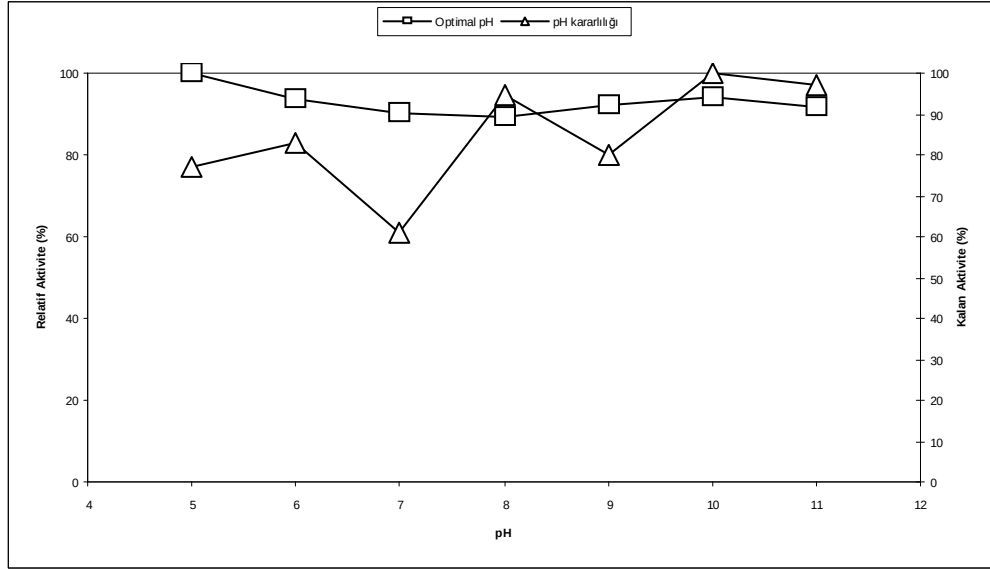
P22 soyu M-9 besi yerinde (pH 6.7) büyütüldüğünde, aktivite 24. saatte yüksek bir değere ulaştıktan sonra 28-32. saatler arasında bu değer yarısına düştü. Kültürün 36. saatinde ikinci kez artarak en yüksek değerine ulaştı. Daha sonraki saatlerde gerek hücre yoğunluğu gerekse aktivite durağan bir seyir izledi. Alkali besi yerinde ise aktivite değerinin 16. saatte birden yükseldiği ve yaklaşık 24. saatte hızla düştüğü, bu besi yerinde alınan en yüksek aktivite değerinin pH 6.7'de elde edilenden daha düşük olduğu görüldü.

3.3. Kültür üst sıvısı ile gerçekleştirilen enzim ön nitelendirme çalışmaları

A28 soyunun kültür üst sıvısı enzimi nitelendirmeye yönelik ön çalışmalara alındı ve oldukça ilginç sonuçlar elde edildi. Buna göre, optimal reaksiyon sıcaklığının belirlenmesine yönelik çalışmalarda kültür üst sıvısındaki enzimin 15-85 °C arasındaki sıcaklıklarda yüksek aktivite değerleri verdiği görüldü ve bu değerlerin birbirine eşit denilebilecek kadar yakın olduğu saptandı. Yine 15-85°C arasında gerçekleştirilen sıcaklık kararlılığı çalışmalarının sonuçları enzim aktivitesinin yüksek düzeyini denenen tüm sıcaklıklarda koruduğunu gösterdi. Üst sıvının 85°C'ta 45 dakika ve 17,5 saat inkübasyonunun ardından verdiği aktivite değerleri sırasıyla, 18,42 U/ml ve 18 U/ml'dir.



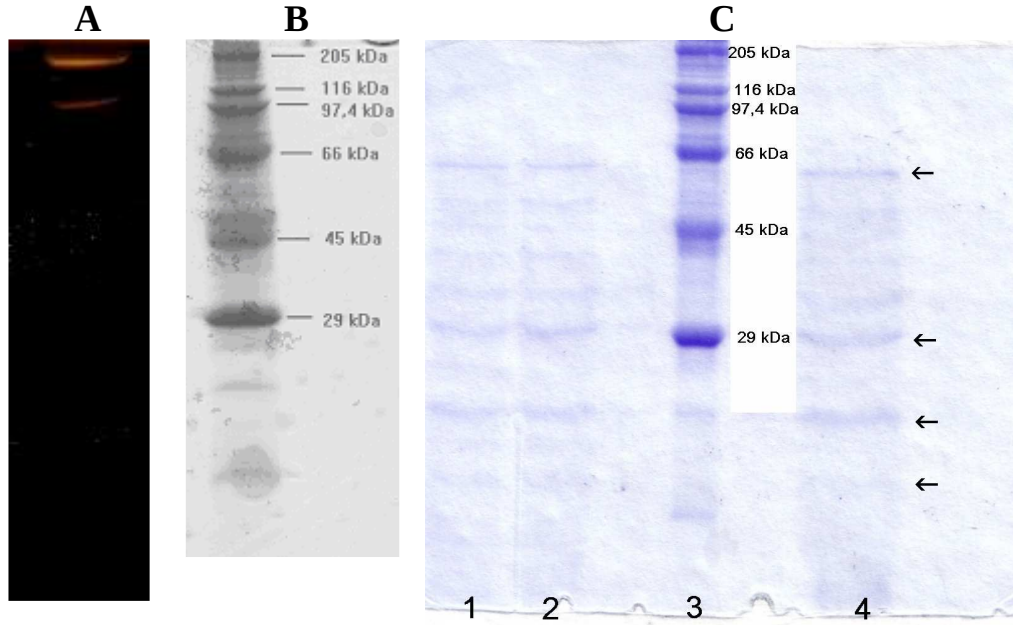
Şekil 3.13. Sıcaklığın α -amilaz aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi



Şekil 3.14. pH'nın α -amilaz aktivitesi ve kararlılığı üzerindeki etkisi

3.4. SDS-PAGE ve zimogram analizleri

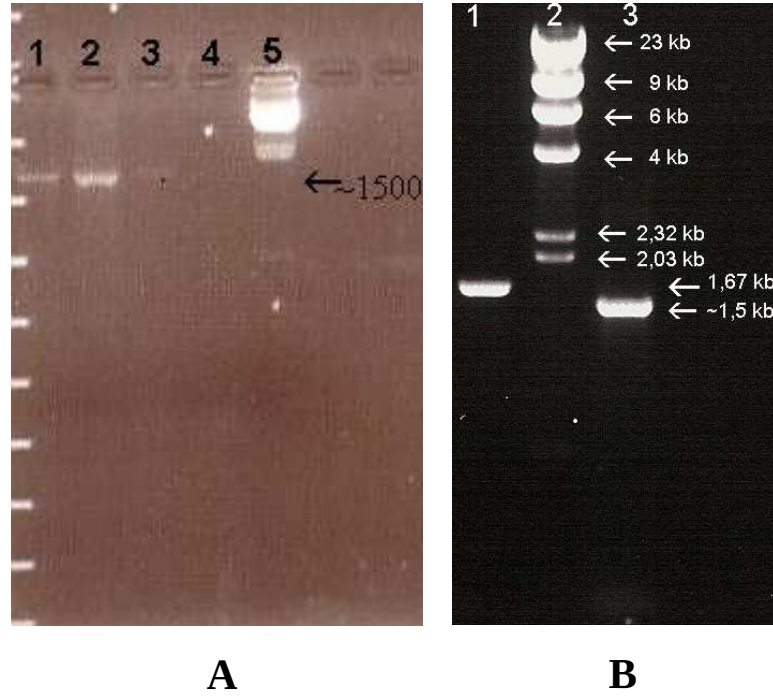
Kültür üst sıvısı ile yapılan SDS-PAGE analizinde bant görülmedi (Şekil 3.15.B). Üst sıvının aseton çöktürmesinin ardından jelde moleküler büyüklükleri sırasıyla ve yaklaşık 60, 30, 23 ve 15 kDa olan bantlar olduğu gözlemlendi (Şekil 3.15.C). Zimogram analizinde yaklaşık 200 ve 100 kDa büyüklüğünde 2 bandın yanı sıra, Şekil 3.15.A'da görüntülenemeyen ve moleküler ağırlıkları yaklaşık 30-45 kDa olan 2 aktif bant daha görüldü.



Şekil 3.15. A) Nişasta zimogram analizi B) Kültür üst sıvısı ve moleküler ağırlık belirteçlerinin SDS profili C) Kuyu 1 ve 2 : Aseton çöktürmesi sonrası 8 kez konsantre edilen kültür üst sıvısının SDS profili Kuyu 3: Moleküler ağırlık belirteçleri (Sırasıyla; karbonik anhidraz: 29, ovalbumin: 45, Bovin Serum Albumin: 66, Fosforilaz b: 97.4, β -galaktosidaz: 116, miyozin: 205 kDa) Kuyu 4: Aseton çöktürmesi sonrası 16 kez konsantre edilen kültür üst sıvısının SDS profili.

3.5. A28 soyu 16S rDNA'sının PCR ile çoğaltımı

Manuel ve kit sistemleri ile yapılan tiplendirme çalışmalarında elde edilen sonuçlar A28 soyunun yeni bir tür olabileceğine işaret ettiğinden, bu soy için 16S rDNA dizi analizinin yapılmasına karar verildi. Bu doğrultuda öncelikle soyun genomik DNA'sı izole edildi ve ardından 16S rDNA PCR ile çoğaltıldı. PCR koşullarının optimizasyonu yapılırken, önce tutunma sıcaklığı olarak 49°C, 1.5, 3.0, 4.0, 5.0 mM MgCl₂ konsantrasyonları denendi. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi analizi sonucunda, çalışılan bütün MgCl₂ konsantrasyonlarında ~1500 bp büyüklüğünde bir bandın yanı sıra, az sayıda özgün olmayan bantlar görüldü. ~1500 bp büyüklüğündeki bandın 3.0 mM MgCl₂ konsantrasyonunda en güçlü olduğu gözlemlendi (Şekil 3.16.A). 5.0 mM MgCl₂ konsantrasyonunda elde edilen bant oldukça zayıftı. Bir sonraki PCR denemesinde yalnızca 1.5, 3.0, 4.0 mM MgCl₂ konsantrasyonları ile çalışıldı ve tutunma sıcaklığı 51°C'a yükseltildi. Agaroz jel elektroforezi sonuçlarına göre en güçlü bantın, 1.5 mM MgCl₂ konsantrasyonunun kullanıldığı örnekte görüldü. Bunun yanında özgün olmayan bantların ilk optimizasyon çalışmasına oranla çok daha az olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.16. A28 soyunun genomik DNA' sının kalıp olarak kullanıldığı I. ve II. PCR ürünlerinin % 1 agaroz jeldeki görünümü A) Tutunmanın 49 °C'ta gerçekleştiği I.PCR , Kuyu 1. 1,5 mM MgCl₂, Kuyu 2. 3,0 mM MgCl₂, Kuyu 3. 4,0 mM MgCl₂, Kuyu 4. 5,0 mM MgCl₂ varlığında PCR ürünü 16S rDNA Kuyu 5. Moleküler belirteç olarak kullanılan λ-DNA^{HindIII} (23; 9; 6; 4; 2,32; 2,03; 0,56; 0,13 kb) B) Tutunmanın 51 °C'ta gerçekleştiği II.PCR , Kuyu 1. Penisilin asilaz geni β-alt biriminin sentezinden sorumlu gen parçası (1,67 kb- belirteç olarak kullanılmıştır), Kuyu 2. Moleküler belirteç olarak kullanılan λ-DNA^{HindIII} (23; 9; 6; 4; 2,32; 2,03; 0,56; 0,13 kb) Kuyu 3. 1,5 mM MgCl₂ varlığında PCR ürünü 16S rDNA

3.6. 16S rDNA dizi analizi çalışmaları

A28 soyunun PCR ürünü 16S rDNA'sının kalıp olarak kullanıldığı dizi analizi çalışmasında otoradyogram filminde bantlar görülemedi. Buna karşın kontrol olarak kullanılan M13 DNA'sının dizisi rahatlıkla okunabildi.

Şekil 3.17' de görülen otoradyogram üzerinden göre M13 DNA' sının dizisi aşağıdaki gibi okundu:

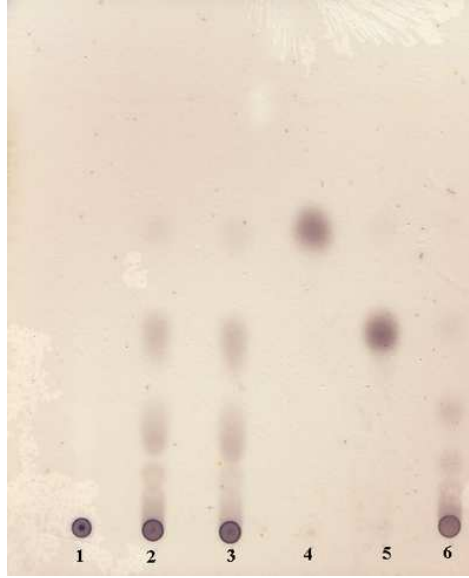
CAA GCT TGC ATG CCT GCA GGT CGA CTC TAG AGG ATC CCC GGG
TTA CCG AGC TCG AAT TCG TAA TCA TGG TCA TAG CTG TTT CCT GTG
TGA AAT TGT TAT CCG CTC ACA ATT CCA CAC AAC ATA CGA GCC
GGA AGC ATA AGT GTA



Şekil 3.17. M13 bakteriyofajı tek iplikli DNA' sının dizi analizi otoradyogramı.

3.7. A28 soyu kültür üst sıvısı ile yapılan ince tabaka kromatografisi

Sodyum fosfat tamponunda çözünmüş % 1 nişasta ile karıştırıldıktan sonra 55 °C'ta inkübe edilen A28 soyu kültür üst sıvısından TLC için inkübasyonun 3. ve 30. dakikalarında alınan her iki örneğin aynı profili gösterdiği belirlendi. Buna göre nişastanın, A28 soyu tarafından kültür ortamına salgılanan α -amilaz ile hidrolizi sonucunda elde edilen temel ürünlerin maltoz, maltotrioz ve maltotetroz olduğu ve çok daha küçük miktarda glukoz olduğu görüldü.



Şekil 3.18. Nişastanın A28 soyu alfa amilazı (kültür üst sıvısı) ile hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin TLC profili. Kuyu 1. Sodyum fosfat tamponunda çözünmüş % 1 çözünür nişasta, Kuyu 2. Nişasta ile karıştırıldıktan sonra 55 °C'ta 3 dakika inkübe edilen A28 soyu kültür üst sıvısı örneği, Kuyu 3. Nişasta ile karıştırıldıktan sonra 55 °C'ta 30 dakika inkübe edilen A28 soyu kültür üst sıvısı örneği, Kuyu 4. Standart olarak kullanılan glukoz (1 µg/µl) Kuyu 5. Standart olarak kullanılan maltoz (1 µg/µl), Kuyu 6. Standart olarak kullanılan malto dekstrin (2 µg/µl)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Amilazlar, dünya enzim pazarında yaklaşık % 25'lik bir paya sahip endüstriyel enzimlerdir (Sidhu ve ark., 1997). Amilaz ailesinin bir üyesi olan α -amilaz, nişasta molekülündeki α -1,4 iç bağlarını rastgele bir şekilde hidroliz ederek glukoz, maltoz ve limit dekstrin oluşturan bir enzimdir (Khajeh ve ark., 2001, Duedahl-Olesen ve ark., 2000). Böylece α -amilaz nişastayı diğer enzimler tarafından kullanılır hale getirerek, nişastanın dönüşüm sürecinde anahtar rolü oynar (Sidhu ve ark., 1997). Nişastanın jelatinizasyon ve sıvılaştırma işlemleri yüksek sıcaklıkta gerçekleştiği için sıcaklık kararlılığı olan enzimlerin kullanılması gerekmektedir. Buna bağlı olarak sıcaklık seven organizmalar bu nitelikli enzimlerin yeni kaynakları olarak ilgi çekmektedir (Bolton ve ark., 1997, Burg 2003, Demirjian ve ark., 2001). Ayrıca günümüzde alkali enzimlerin önemi giderek artmakta olup, çeşitli endüstrilerde kullanımları önümüzdeki yıllarda daha da fazlalaşacaktır. Deterjan endüstrisi başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda alkali α -amilaz tercih edilmekte ve bu da alkali sever mikroorganizmalara olan ilgiyi arttırmaktadır. (Horikoshi, 1999)

Son yıllarda *Bacillus* cinsi üyesi sıcak sever, sporlu bakteriler; sıcaklık kararlılığı ve alkali ortamlarda çalışma özelliği olan enzimleri üretmeleri nedeniyle birçok endüstriyel süreçte kullanılmakta, yeni soylar araştırılmaktadır. *Bacillus* cinsine ait yeni izolatların tanımlanması ve karakterizasyonu aşamalarında halen birçok zorlukla karşılaşmaktadır. Bu durum temelde, *Bacillus* cinsi üyelerinin genotipik ve fenotipik çeşitliliğine bağlıdır (Mora ve ark., 1998).

Bu çalışmada yerel ekosistemlerden izole edilen *Bacillus* soyları α -amilaz üretkenliklerine göre taranarak seçilmiş ve enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. *Bacillus* soylarının tür düzeyinde tanımlanması manuel olarak gerçekleştirilen temel biyokimyasal testler ve mikroskopik inceleme ile yapılmış, seçilen bazı soylar daha sonra API kitleri ve VITEK tanımlama sistemi kullanılarak isimlendirilmeye çalışılmıştır. Seçilen izolatlar arasında her üç yöntemin bulguları kullanılarak ortak bir tür ismi verilemeyen soylar bulunmaktadır.

Örneğin; P22 soyunun yapılan manuel testler ve mikroskopik inceleme sonucunda *B. megaterium* olabileceği düşünülmüştür. Ancak API kiti ile yapılan

çalışmalarda bu soy *B. coagulans*, VITEK alışmalarında *B. cereus* olarak adlandırılmıştır. Soyun hangi türe ait olduğunun tam olarak belirlenmesi amacıyla amilaz ve proteaz enzimleri üretimi, nişasta-agar ve skim-milk agarda pigment oluşumu, jelatin hidrolizi testleri ile mikroskopik inceleme tekrar edilmiştir. Tekrar edilen testler sonucunda özellikle mikroskopik görünüm, nişastalı ve kazeinli agarlarda sarı renkli pigment oluşturma özellikleri nedeniyle bu soyun daha önceki manuel testler sonucu adlandırıldığı gibi *B. megaterium* olduğuna karar verilmiştir.

P19 soyu için API ve VITEK kitlerinin aynı isimleri ne sürdüğü, buna karşın manuel testlerle bu soya farklı bir tür adı verildiği gözlenmiştir. P19 soyunun anaerop üreme yeteneğinde olduğu manuel olarak tekrar edilen testlerle doğrulanmış ve soyun bu özelliğinden dolayı öncelikle *B. licheniformis* olduğu, daha düşük bir olasılıkla da API ve VITEK kitlerinin önerdiği şekilde *B. subtilis* olabileceğine karar verilmiştir.

A3, A18 ve A23 soylarına her üç yöntem eliyle benzer isimler verilmiş ve bu soyların birbiri ile aynı özellikleri gösteren ve tam olarak ayırdedilmesi güç olan *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens* türlerine ait olabileceğine karar verilmiştir.

Yapılan manuel testler sonucunda elde edilen veriler ışığında hiçbir *Bacillus* türüne benzetilemeyen A4 ve A7 soyları için API ve VITEK kitlerinin ortak birer isim önerdiği görülmüş ve bu soylardan A4 için manuel olarak tekrar edilen anaerop üreme, nişasta ve proteaz üretimi testleri ile mikroskopik inceleme sonucunda soyun kitlerin önerdiği isim olan *B. cereus* türüne ait olduğuna karar verilmiştir. A7 soyunun nişasta hidrolizi ve proteaz üretimine tekrar bakılmış ve bu soyun da kit çalışmalarında önerilen isim olan *B. subtilis* olduğu düşünülmüştür.

A26 ve A28 soylarının tanımlanmasında ilginç sonuçlarla karşılaşılmıştır. Manuel testler sırasında bu soyların 35°C'ta reyemedikleri, üremeleri için 45-50°C gibi yüksek sıcaklığa gereksinim duydukları görülmüş ve soylardan A26'nın *B. stearothermophilus*, A28'in ise *B. subtilis* ya da *B. licheniformis* olabileceği düşünülmüştür. Ancak API kitleri her iki soyu herhangi bir *Bacillus* türü olarak adlandıramamış, VITEK sistemi ise A26 soyuna *B. licheniformis* adını vermiştir. A28 soyu için sistemin önerdiği ismin *B. licheniformis* olmasına karşın, bu adın bu soy için tam olarak geçerli olamayacağı belirtilmiştir. İlginç olan, bu soyların daha önce 65°C'ta reyebilmelerine karşın 35°C'ta reyememeleri ve tekrar edilen

testlerinde bu sonuçların tam tersinin görülmesidir. Bu sonuçlar bakterilerin çeşitli koşullara bağlı olarak ya da tekrarlanan pasajlama işlemleri ile birtakım özelliklerini değiştirebilme yeteneklerini akla getirmektedir. Sonuç olarak, bu soylardan A26'nın 35°C ve 65°C'ta üreme özelliklerinden dolayı *B. licheniformis*, A28'in ise *B. licheniformis*'e bir ölçüde benzemesine karşın farklı ve yeni bir tür olabileceği düşünülmektedir.

Her ne kadar API kitleri ve VITEK sistemi gerek zaman, gerekse insan emeği açısından daha avantajlı görünseler de, mikroorganizmaların tanınması ve tanımlanmasındaki önemi büyük olan mikroskobik inceleme aşamasını kapsamadıklarından yeterlilikleri tartışılabilir. Ayrıca özellikle API kitlerinin değerlendirme aşamasında kuyularda oluşan renk reaksiyonları farklı yorumlanabileceğinden dikkatli kullanılmaları gerekmektedir. *Bacillus* soylarının kesin olarak adlandırılmasında moleküler tiplendirme yöntemlerinin kullanımı giderek öne çıkmaktadır.

Besi yeri bileşimi ve bileşenlerin konsantrasyonu bakteriler, mayalar ve *Aspergillus* türlerinde hücre dışı amilaz üretimi ve büyümeyi büyük ölçüde etkilemektedir (Srivastava ve Baruah, 1986). Bu bilgiler çalışmamızda seçilen soylarla yapılan aktivite çalışmaları ile bir kez daha doğrulanmıştır. Seçilen 9 soy α -amilaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle LB besi yerinde büyütülmüş, ancak alınan aktivite düzeyleri yeterli bulunmamıştır. Bunun üzerine farklı besi yerleri denenmiştir. Aktivite değerlerinde yükselmenin görüldüğü M-9 besi yeri ayrıca % 1 oranında nişasta içermektedir. Sonuçlar α -amilazın substratı olan nişastanın enzim üretimini uyardığını göstermiştir. Benzer olarak Srivasta ve Baruah amilaz sentezinin bakteriler glukoz, maltoz ya da sukroz içeren bir besi yerinde büyütüldüğünde baskılandığını, fakat nişasta ya da diğer polisakkaritleri içeren ortamda büyütüldüğünde oldukça yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Ancak literatürde amilaz üretimi için nişastanın gerekli olmadığını gösteren yayınlar da bulunmaktadır (Srivastava ve Baruah, 1986).

Öte yandan besi yerinde bulunan nitrojen kaynağının konsantrasyonu da α -amilaz üretiminde kritik bir rol oynayabilir. Haq ve arkadaşları (2003), çalışmalarında farklı miktarlarda (0,5-2,5 g/l) nutrient broth içeren besi yerlerinde

büyütülen soylar için yaptıkları aktivite testleri sonucunda, en iyi α -amilaz aktivitesini 0,5 g/l nutrient broth içeren besi yeri ile almışlardır.

α -Amilaz aktivitesini etkileyen başka birçok faktörün olduğu da bilinmektedir. Örneğin ortamda bulunan çeşitli divalent ve trivalent katyonların hücre dışı enzim salgılanmasında etkili olabileceği görülmüştür. Bu iyonların etkileri enzim tipine bağlı olarak değişebilmektedir. Yapılan bir çalışmada α -amilaz aktivitesinin Hg^{2+} , Cu^{2+} ve Fe^{3+} varlığında inhibe olduğu, buna karşın Zn^{2+} 'nın inhibisyon etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Mamo ve Gessesse, 1999). Başka bir çalışmada Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} ve Ba^{2+} divalent katyonlarının amilaz üretimini küçük bir miktarda uyardığı, buna karşın Zn^{2+} ve Mn^{2+} 'nın büyüme ve amilaz üretimini etkilemediği gözlenmiştir (Srivastava ve Baruah, 1986). α -Amilazların sıcaklık kararlılığının özellikle ortamda Ca^{2+} iyonu bulunduğunda çok daha yüksek olduğu bilinse de, Jin ve arkadaşları (2001), yaptıkları çalışmada kullandıkları *Bacillus* sp. JF₂ soyu α -amilazının aktivitesinin, endüstride yaygın olarak kullanılan ve *B.licheniformis*' ten elde edilen termostabil α -amilazdan farklı olarak Ca^{2+} iyonu ile bağlantılı olmadığını rapor etmişlerdir. Tez çalışmasında LB besi yerine göreceli olarak çok daha yüksek aktivite değerlerinin alındığı minimal besi yeri; Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ve Cu^{2+} iyonları içermektedir. Bu iyonlardan hangilerinin tanımlanan soyların aktif enzim üretimi üzerinde doğrudan etkin olduğu ve optimal konsantrasyonları daha ileri çalışmalarda ayrıca belirlenecektir.

Tez çalışması kapsamında yapılan aktivite testlerinde, kültür besi yeri miktarının, kültür kabına oranı öncelikle 1/5 olarak düzenlenmiş, ancak daha sonra bu oranın 1/3'e düşürülmesinin α -amilaz üretimini arttırdığı görülmüştür. Buna göre ilgili soyların hücre dışı α -amilaz üretiminin göreceli daha az oksijenlenen kültürlerde daha etkin olduğu çıkarımında bulunulabilir.

pH'sı 6.7 olan besi yerinde büyütülen soylar için yapılan aktivite çalışmalarında elde edilen en yüksek aktivite değeri 23.34 U olup, Gönen Dağ Ilıcasi'ndan alınan toprak örneklerinden izole edilen P22 soyundan elde edilmiştir. Çalışılan soylar arasında besi yeri pH değerinin 6.7 olduğu koşullarda aktivitesi en düşük olanı A4 soyudur. Bu soy için en yüksek aktivite değeri 9.8 U olarak bulunmuştur.

α -Amilazın yanı sıra aynı zamanda etkin bir alkalen proteaz üreticisi olan P22 soyunun besi yeri pH'sı 9.3'e yükseltildiğinde, en yüksek aktivite değerinin 7.9 U'ye düşmesi ve aktif enzim üretiminin pH 6.7'de görülenden farklı olarak hızla azalması ilginçtir. Aksine A4 soyu büyütüldüğü besi yerinin pH'sı 6.7'den 9.3 değerine yükseltildiğinde daha yüksek ve kalımlı bir enzimatik aktivite profili göstermiştir. Bu soylar, alkalisever enzim üretimi yönünden ayrıca irdelenecektir.

P22 soyunun yanı sıra, A26, A28 ve P19 soyları da alkalen proteaz üretmektedir. α -Amilaz ile birlikte endüstriyel enzimler arasında önemli bir yere sahip olan alkalen proteaz üreticisi bu soyların endüstriyel süreçlerde kullanım potansiyeli daha sonraki çalışmalarda araştırılacaktır.

α -Amilazın endüstriyel uygulamalarının genellikle yüksek sıcaklıkta gerçekleşmesi bu enzimi üreten termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalara olan ilgiyi arttırmıştır. Endüstriyel uygulamalarda özellikle *B. licheniformis* ve *B. stearothermophilus* soylarından elde edilen ve 130-140°C'ta aktif olan α -amilazlar ile en yüksek aktivitesini 80-100°C'ta gösteren *Pyrococcus furiosus* amilazı kullanılmaktadır (Egas ve ark., 1998, Hough ve Danson, 1999). Bunun yanında *B. subtilis* soyları da endüstriyel süreçlerde sıkça kullanılır. Ancak *B. subtilis* α -amilazının 60°C'ın üzerinde kararlı olmaması bu türe ilgiyi azaltmaktadır (Uguru ve ark., 1997). Öte yandan *B. licheniformis* ve *Aspergillus oryzae* ile yapılan bir çalışmada, sıcaklığın rölatif α -amilaz aktivitesini azaltabildiği de görülmüştür (Apar ve Özbek, 2003).

Tez kapsamında 45°C'ta inkübe edilen soylardan elde edilen aktivite değerleri A26 soyu için 13.1 U ve A28 soyu için 13.6 U olup, oldukça yüksek değerler olarak görülmektedir. Bu soylar tarafından üretilen enzimler; saflaştırılmalarını takiben öncelikle reaksiyon sıcaklığı ve sıcaklık kararlılığı yönünden irdelenecektir.

Bu tez çalışmasında A28 soyu kültür üst sıvısı ile yapılan enzim ön nitelendirme çalışmalarında alınan sonuçlar dikkat çekicidir. Bu soyun ürettiği α -amilazın, 15-85°C arasında denenen tüm sıcaklıklarda ve 5-11 arasında denenen tüm pH değerlerinde verdiği yüksek enzimatik aktivitenin yanı sıra, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında kararlılık göstermesi; bu enzimin yüksek sıcaklık ya da uç alkali pH koşulları gerektiren endüstriyel süreçlerde kullanılmak üzere elverişli olduğuna işaret etmektedir. Aktivite değerlerinde görülen küçük farklılıkların deneysel

hatalardan kaynaklandığı düşünülmüştür (Şekil 3.13-3.14). Literatürde termofilik bir *Bacillus* soyundan elde edilen ve pH 5.5-9.0 aralığında kararlı olan ayrıca 80°C'ta 4 saat inkübasyonun ardından aktivitesinin % 50'sini koruyan iki amilaz bildirilmiştir (Mamo ve Gessesse, 1999). Başka bir çalışmada, *B. flavothermus* α -amilazının pH 5.5-6.0'da ve 60°C'ta optimal aktivite verdiği, ayrıca 60°C'ta 30 dakika inkübasyonun ardından kararlılığını tamamen koruduğu gösterilmiştir (Boltonet ve ark., 1997). Literatürde sıcak su kaynaklarından ve topraktan izole edilen bir *Bacillus* soyunun ürettiği enzimin pH 5.6 ve 70°C'ta optimal aktivite gösterdiği, 80°C'ta 1 saat inkübasyon sonrasında ise aktivitesinin % 75'ini koruduğu bildirilmiştir (Sidhu ve ark., 1997). Benzer bir çalışma Ali ve arkadaşları tarafından yapılmış, kendi izolatları olan termofilik *Bacillus* soyunun pH 4.5-8.0 aralığında aktif bir amilaz ürettiği, enzimin optimal pH'sının 5.6, optimal sıcaklığının ise 82°C olduğu görülmüştür. Çeşitli *Bacillus* soylarından elde edilen α -amilazların değişik biyokimyasal özellikleri olduğu açıkça görülmekle birlikte, termofilik soylardan elde edilen enzimlerin optimum sıcaklık değerlerinin yüksek olması ve yüksek sıcaklıkta kararlı olmaları bu enzimleri öne çıkarmaktadır. Bu tez çalışmasında A28 soyu tarafından kültür ortamına salgılanan α -amilazı nitelendirmeye yönelik ön çalışmalar; enzimin geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktif ve kararlı olduğunu ayrıca elde edilen değerlerin literatürdeki en iyi örneklerle karşılaştırılabilir düzeyde bulunduğunu göstermiştir. Enzimin nitelendirilmesine yönelik testler ve kinetik çalışmalar, saflaştırma sürecini takiben gerçekleştirilecektir. Başta A28 soyu olmak üzere bu tez çalışması kapsamında izole edilen α -amilaz üreticisi yerel soylar, daha üretken rekombinant soyların geliştirilmesi için gen kaynağı olarak kullanılabilecektir.

A28 soyu kültür üst sıvısı ile yapılan SDS-PAGE analizinde belirgin bantların görülmemesi enzimin yeterince konsantre olmamasından kaynaklanmaktadır. Aksine, yapılan zimogram analizinde lugol ile boyanmanın ardından, açık renkli bantlar çok net olarak görülmüş, ancak bu bantların tümü görüntülenememiştir. Zimograma konulan kültür üst sıvısı aseton çöktürmesi ile 8 ve 16 kez konsantre edildikten sonra yapılan SDS-PAGE analizinde elde edilen profil, Şekil 3.15.C'de görülmektedir. Buna göre üst sıvıdaki protein bantları arasında en yoğun olanların molekül büyüklükleri sırasıyla ve yaklaşık olarak; 60, 30, 23 ve 15 kDa'dır. Zimogram analizinde elde edilen bantların moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak 200,

100 ve 30-45 kDa'dur. Literatürdeki bilgilerin ışığında amilolitik aktiviteye sahip bantların daha çok 40-60 kDa büyüklüğünde (Tablo 1.3., Haki ve Raksit, 2003) olması beklenmekte, moleküler ağırlığı daha yüksek bantların, zimogramdaki artefaktlar veya amilaz öncülleri olabileceği düşünülmektedir. SDS-PAGE ve zimogram anlizleri hücre dışı protein özütünün amonyum sülfat çöktürmesi ile zenginleştirilmesi ve enzimin daha ileri düzeyde saflaştırılmasını takiben tekrarlanacaktır.

A28 soyu α -amilazının nişastayı hangi ürünlere hidroliz ettiğini belirlemek üzere yapılan TLC'de temel ürünlerin maltoz ve maltodekstrinler olduğu, buna karşın alfa amilazların genel etki mekanizmaları ile uyumlu olarak, çok daha az miktarda glukoz olduğu görülmüştür. İnkübasyonun 3 ve 30. dakikalarında alınan örneklerde ürün profilinin aynı olması; gerek maltodekstrinlerin gerekse nişastanın tam hidroliz ürünü olan glukozun miktarının reaksiyonun ileri aşamalarında belirgin şekilde artmadığına, bu nedenle A28 soyu alfa amilazının başlangıç aktivitesinin değerlendirilmesinin yeterli olacağına işaret etmektedir.

Günümüzde klasik tanımlama yöntemlerinin yanında sıklıkla kullanılan 16S rDNA dizi analizi birçok türün tanımlanmasında, türler arası akrabalıkların gösterilmesinde yararlı bir yöntemdir. Örneğin Sacchi ve ark. yaptıkları çalışmada (2002), *B. anthracis*, *B. cereus* ve *B. thuringiensis* türlerinin 16S rRNA genleri arasında % 1'den küçük bir farklılık olduğunu göstermişler, böylesi küçük farklılıkların tür tanımlamasında önemli olabileceğini vurgulamışlardır. Yakın akraba olan bu türlerin 16S rRNA genleri arasındaki küçük farklılıkların, onların patojenite başta olmak üzere birçok özelliklerini etkileyebileceği düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında kullanılan yöntemlerle hangi *Bacillus* türüne ait olduğu tam olarak belirlenemeyen A28 soyunun 16S rDNA dizi analizi için öncelikle bu bölge PCR aracılığıyla çoğaltılmış, agaroz jelde görülen ürünün 16S rDNA için beklenen moleküler büyüklükte olduğu belirlenmiştir. PCR ürününün kalıp olarak kullanıldığı DNA dizileme çalışmasında okunabilir bantlar elde edilememiş, kalıp DNA'nın alkali denatürasyonu sırasında yitirildiği sonucuna varılmıştır. Aynı analizde kontrol olarak kullanılan M13 DNA' sının dizi analizinin başarılı olması, dizi analizi sisteminin ve reaksiyonlarının işleyişinde problem

olmadığını göstermiştir. A28 soyunu tür düzeyinde tanımlama çalışmaları tekrarlanacak 16S rDNA analizleri ile bütünlenecektir.

Amilazların nişastaya dayalı çeşitli endüstrilerde kullanımının son yıllarda çok yaygınlaşmasına karşın bu enzimin ticari kullanımı birkaç bakteri ve fungus soyuyla sınırlıdır (Gupta ve ark., 2003). Bu tez çalışması ile yerel ekosistemlerden taranarak seçilen α -amilaz üreticisi soylar, ülkemizde sıcaklığa ve alkali koşullara dayanıklı enzimlerin endüstriye kazandırılmasına yönelik çalışmalara katkıda bulunacak; moleküler tiplendirme çalışmalarının sonuçları olası yeni soyların tanımlanmasına olanak verecek ve üretken soylardan hareketle geliştirilecek rekombinant soylar eliyle istenen özellikte ve miktarda enzim üretimi sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Ali, B.M., Mezghani, M., and Bejar, S., A thermostable α -amylase producing maltohexaose from a new isolated *Bacillus* sp. US100: study of activity and molecular cloning of the corresponding gene, *Enzyme and Microbial Technology*, 24:584-589, 1999.
2. Apar, D.K., and Ozbek, B., α -Amylase inactivation by temperature during starch hydrolysis, *Process Biochemistry*, 39: 1137-1144, 2004.
3. Baron, E.J., Peterson, L.R., and Finegold, S.M., Bailey and Scott' s Diagnostic Microbiology, 9th Edition, St.Louis, Mosby, 451-456, 1994.
4. Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J.L., and Aragno, M., Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80°C), *Applied and Environmental Microbiology*, 62:1723-1727, 1996.
5. Bergmann, F. W., Abe, J., and Hizukuri, S., Selection of microorganisms which produce raw-starch degrading enzymes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27:443-446, 1998.
6. Bertoldo, C., and Antranikian, G., Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria, *Current Opinion in Chemical Biology*, 6:151-160, 2002.
7. Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T., Aragno, M., Thermophilic bacterial communities in hot compost as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods, *FEMS Microbiology Ecology*, 28: 141-149, 1999.
8. Bolton, D. J., Kelly, C. T., and Fogarty, W. M., Purification and characterization of the α -amylase of *Bacillus flavothermus*, *Enzyme and Microbial Technology*, 20:340-343, 1997.
9. Burg, B., Extremophiles as a source for novel enzymes, *Current Opinion in Microbiology*, 6:213-218, 2003.
10. Carmelo, V., Florido, A., Vinhas, I., and Roserio, J.C., Physiological responses of *Bacillus stearothermophilus* continuous culture to carbon source concentration and temperature shifts, *Process Biochemistry*, 38:763-770, 2002.
11. Crabb, W.D., and Mitchinson, C., Enzymes involved in the processing of the starch to sugars, *Trends in Biotechnology*, 15:349-352, 1997.

12. Demirjian, D.C., Moris-Varas, F., and Cassidy, C.S., Enzymes from extremophiles, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5:144-151, 2001.
13. Duarte, G.F., Rosado, A.S., Seldin, L., Keijzer-Wolters, A.C., and Elsas, J.D., Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community, *Journal of Microbiological Methods*, 32: 21-29, 1998.
14. Duedahl-Olesen, L., Kragh, K.M., and Zimmermann, W., Purification and characterisation of a malto-oligosaccharide-forming amylase active at high pH from *Bacillus clausii* BT-21, *Carbohydrate Research*, 329:97-107, 2000.
15. Egas, M. C. V., Costa, M. S., Cowan, D. A., Pires, E. M. V., Extracellular α -amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: purification and biochemical characterization, *Extremophiles*, 2:23-32, 1998.
16. Frederick, M., *Current protocols in molecular biology*, 1993.
17. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., and Chauhan, B., Microbial amylases: a biotechnological perspective, *Process Biochemistry* 38:1599-1616, 2003.
18. Haki, G.D., and Rakshit, S.K., Developments in industrially important thermostable enzymes:a review, *Bioresource Technology*, 89:17-34, 2003.
19. Haq, I., Ashraf, H., Iqbal, J., and Qadeer, M.A., Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium, *Biosource Technology*, 87:57-61, 2003.
20. Harwood, C.R., *Bacillus subtilis* and its relatives:molecular biological and industrial workhorses, *Trends in Biotechnology*, 10:247-256, 1992.
21. Hill, G.T., Mitkowski, N.A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L.R., Jurkonie, D.D., Ficke, A., Ramirez, S.M., Lynch, S.T., Nelson, E.B., Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities, *Applied Soil Ecology*, 15: 25-36, 2000.
22. Horikoshi, K., Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63:735-750, 1999.
23. Horikoshi, K., Alkaliphiles-from an industrial point of view, *FEMS Microbiology Reviews*, 18:259-270, 1996.

24. Hough, D. W., and Danson, M. J., Extremozymes, *Current Opinion in Chemical Biology*, 3:39-46, 1999.
25. Jin, F., Li, Y., Zhang, C., Yu, H., Thermostable α -amylase and α -galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp. J.F strain, *Process Biochemistry*, 36:559-564, 2001.
26. Kandra, L., α -Amylases of medical and industrial importance, *Journal of Molecular Structure*, 666-667: 487-498, 2003.
27. Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B., Moosavi-Movahedi, A. A., Nemet-Gorgani, M., Chemical modification of lysine residues in *Bacillus* α -amylases: effect on activity and stability, *Enzyme and Microbial Technology*, 28:543-549, 2001.
28. Kirk, O., Borchert, T.V., and Fuglsang, C.C., Industrial enzyme applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 13:345-351, 2002.
29. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., and Winn, Jr., W.C., *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th Edition, Lippincott, Philadelphia, 651-664, 1997.
30. Kwak, Y.S., Akiba, T., and Kudo, T., *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 8:363-367, 1998.
31. Lawler, David, Smith, Steven, Enzyme-producing strains of *Bacillus subtilis*, US Patent and Trademark Office, 2000.
32. Llarch, A., Logan, N.A., Prieton, M.J., Guinea, J. Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on deception island, South Shetland Archipelago. *Microbial Ecology* 1997;34:58-65.
33. Lim, W.j., Park, S.R., An, C.L., Lee, J.Y., Hong, S.Y., Shin, E.C., Kim, E. J., Kim, J.O., Kim, H., Yun, H.D., Cloning and characterization of a thermostable intracellular α -amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8, *Research in Microbiology*, 154: 681-687, 2003.
34. Mamo, G. and Gessesse, A., Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α -amylases from a thermophilic *Bacillus*, *Enzyme and Microbial Technology*, 25:433-438, 1999.
35. Martinez, T.F., Alarcon, F.J., Diaz-Lopez, m., Moyano, F.J., Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch, *Electrophoresis*, 21: 2940-2943, 2000

36. Martins, R. T., Davids, W., Al-Soud, W. A., Levander, F., Radström, P., Hatti-Kaul, R., Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes, *Extremophiles*, 5:135-144, 2001.
37. Messaoud, E.B., Ali, M.B., Elleuch, N., Masmoudi, N.F., and Bejar, S., Purification and properties of a maltoheptaose – and maltohexaose-forming amylase produced by *Bacillus subtilis* US116, *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 662-666, 2004.
38. Mora, D., Fortina, M. G., Nicastro, G., Parini, C., and Manachini, P. L., Genotyping characterization of thermophilic Bacilli: a study on new soil isolates and several reference strains, *Res. Microbiology*, 149:711-722, 1998.
39. Nielsen, J. E., Borchert, T. V., Protein engineering of bacterial α -amylases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543:253-274, 2000.
40. Ntougias, S and Russell, N., *Bacillus* sp. WW3-SN6, a novel facultatively alkaliphilic bacterium isolated from the washwaters of edible olives, *Extremophiles*, 4: 201-208, 2000.
41. Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., and Mohan, R., Advances in microbial amylases, *Biotechnological Applied Biochemistry*, 31:135-152, 2000.
42. Prub, B. M., Francis, K. P., Stetten, F. V., and Scherer, S., Correlation of 16 S Ribosomal DNA signature sequences with temperature-dependent growth rates of mesophilic and psychrotolerant strains of the *Bacillus cereus* group, *Journal of Bacteriology*, 2924-2630, 1999.
43. Sacchi, C.T., Whitney, A.M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R.S., Popovic, T., Sequencing of 16S rRNA Gene: A Rapid Tool for Identification of *Bacillus anthracis*, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 8, No.10, 2002.
44. Sarrias, J.A, Valero, M., and Salmeron, M.C., Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice, *Food Microbiology*, 19:589-589, 2002.
45. Shaw, A., Bott, R., and Day, A.G., Protein engineering of α -amylase for low pH performance, *Current Opinion in Biotechnology*, 10:349-352, 1999.

46. Sidhu, G.S., Sharma P., Chakrabarti T., and Gupta J.K., Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase, *Enzyme and Microbial Technology*, 21:525-530,1997.
47. Slepecky, R.A. and H.E.Hemphill, *The Prokaryotes*, 2nd Edition, A.Balows et.al., Chapter 76, Springer-Verlag, New York Ind., Secaucus, New Jersey, 1992.
48. Sneath, Peter H.A., Section 13: Endospore-forming Gram-positive rods and cocci / Section 16: Identification of Unknown Bacteria, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, Williams and Wilkins, 2:13, 1104-1139, 2:16, 1986.
49. Srivastava, R.A.K., and Baruah, J.N., Culture conditions for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 52:179-184,1986.
50. Stackebradt, E. And Lang, E., *Molecular Detection and Identification of Procaryotes*, OECD Workshop-Molecular Methods for Safe Drinking Water, Interlaken, 1998.
51. Tanner, M.A., Coleman, J., Everett, C.L., Robles, S.J., Dilworth, M.R., Yang, M.M., Youvan, D., *Multispectral Bacterial Identification*, *Biotechnology et alia*, 6: 1-9, 1995.
52. Travers, R.S., Martin, P.A.W., and Reichelderfer, C.F., Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp., *Applied and Environmental Microbiology*, 53:1263-1266, 1987.
53. Turnball, P.C.B. and Kramer, J.M., *Manual of Clinical Microbiology*, 6th Edition, Washington D.C.ASM press, 349-356,1995.
54. Tuzlakoglu, M., Balcı, H., Battal, M., Gökmen, F., Öztürk, İ.S., Artunkal, S., ve Gümüşel, F., Yerel kaynaklardan endüstriyel enzim üreticisi bakteri soylarının seçilmesi ve tanımlanmasına yönelik çalışmalar, XIII.Biyoteknoloji Kongresi, Çanakkale, 2003.
55. Uguru, G.C., Robb, D.A., Akinyanju, J.A., and Sani, A., Purification, characterisation and mutagenic enhancement of a thermoactive α -amylase from *Bacillus subtilis*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19:273-279, 1997.

56. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, d.j., 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703, 1991.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Sakarya’ da doğdu. 1997 yılında İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimine başladı. 2001 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Enstitü’ de yüksek lisans eğitimine devam etmekte ve araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.