



**NEVŞEHİR KOZAKLI KAPLICALARINDAN İZOLE  
EDİLEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU,  
İDENTİFİKASYONU, *Bacillus licheniformis* SO7'DEN  
 $\alpha$ -AMİLAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI  
VE KARAKTERİZASYONU**

**Sultan ÖLMEZ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Bilim Dalı**

**Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU**

**2017**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEVŞEHİR KOZAKLI KAPLICALARINDAN İZOLE EDİLEN  
TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU,  
İDENTİFİKASYONU, *Bacillus licheniformis* SO7'DEN  $\alpha$ -AMİLAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Sultan ÖLMEZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM  
2017

Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU

**NEVŞEHİR KOZAKLI KAPLICALARINDAN İZOLE EDİLEN TERMOFİLİK  
BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, *Bacillus licheniformis* SO7' DEN  
 $\alpha$ -AMİLAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Doç.Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında, Sultan ÖLMEZ tarafından hazırlanan bu çalışma, ~~06.10.2017~~ tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** / ~~oy çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Doç.Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Doç.Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun ~~02.11.~~2017 tarih ve ...~~43~~.../...~~30~~... nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Cavit KAZAZ**  
Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### NEVŞEHİR KOZAKLI KAPLICALARINDAN İZOLE EDİLEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, *Bacillus licheniformis* SO7'DEN $\alpha$ -AMİLAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Yüksek Lisans Tezi

Sultan ÖLMEZ

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Bu tez çalışması kapsamında; Nevşehir-Kozaklı Kaplıcasından alınan su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirildi. Yapılan bu çalışma sonucunda izolatların %99 oranında *Bacillus licheniformis* ve *B. paralicheniformis*'e benzerlik gösterdiği tespit edildi. Bu izolatlardan petri denemeleri sonucunda en yüksek amilaz aktivitesi veren *B. licheniformis* SO7 suşu seçilerek, bu izolattan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enzimi nişasta afinite metoduyla tek basamakta saflaştırıldı ve biyokimyasal yolla karakterize edildi. %28,65 verimle 1,95 kat saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE jel elektroforez yöntemiyle yaklaşık 83,17 kDa olarak hesaplandı.  $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum pH 7,0 ve optimum sıcaklık 90°C olarak belirlendi. Amilaz enziminin geniş alkali pH aralığında (pH 7,0-11,0) stabil kaldığı görüldü. Enzimin 80°C gibi yüksek bir sıcaklıkta 120 dk sonunda aktivitesinin yaklaşık olarak %80'ini koruduğu tespit edildi. *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin Tween-20 ve Triton X-100 gibi bazı yüzey aktif maddeleri varlığında amilolitik aktivitesinin arttığı belirlendi. Organik çözücülere karşı yüksek bir stabilite gösteren enzimin %30 aseton varlığında aktivitesinin %73'ünü koruduğu görüldü. K<sup>+</sup> iyonunun enzimin aktivitesini arttırdığı, EDTA varlığında ise enzim stabilitesinin %86 oranında korunduğu belirlendi. Ayrıca CaCl<sub>2</sub> bileşiğinin  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesini arttırdığı tespit edildi.  $\alpha$ -amilaz enzimi için en yüksek substrat spesifitesi pirinç nişastası olarak saptandı. *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enzimi için K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri sırasıyla 3,24 mg/mL ve 204,08 mmol.mL<sup>-1</sup>.dk<sup>-1</sup> olarak bulundu.

2017, 107 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus licheniformis*,  $\alpha$ -amilaz, nişasta afinite metodu, termofilik bakteri, enzimatik karakterizasyon, saflaştırma

## ABSTRACT

Master Thesis

### ISOLATION, IDENTIFICATION OF THERMOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM THERMAL SPRINGS OF NEVŞEHİR- KOZAKLI, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF $\alpha$ -AMYLASE ENZYME FROM *Bacillus licheniformis* SO7

Sultan ÖLMEZ

Ataturk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics  
Department of Biotechnology

Supervisor: Assoc. Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

As part of this thesis research; Isolation and molecular characterization of thermophilic bacteria was performed on the water samples taken from the thermal water sources of Nevşehir-Kozaklı. As a result of this study, it was detected that the isolates had a similarity to *Bacillus licheniformis* and *B. paralicheniformis* at a rate of 99%.

*B. licheniformis* SO7 strain which gives the highest amylase activity as a result of the petri dishes from these isolates was selected, extracellular  $\alpha$ -amylase enzyme from these isolates was purified in one step by using starch affinity method and characterized biochemically. The molecular weight of the enzyme purified 1,95 fold with 28,65% efficiency was found to be about 83,17 kDa by using SDS-PAGE gel electrophoresis method. For the  $\alpha$ -amylase enzyme it was determined that; the optimum pH was 7,0 and the optimum temperature was 90°C. The amylase enzyme seemed to be stable in the broad alkaline pH range (pH 7,0-11,0). It has been found that the enzyme protects approximately 80% of its activity after 120 min at temperature of 80°C. It has been determined that amylolytic activity of *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amylase enzyme increased in the presence of some surfactants such as Tween-20 and Triton X-100. The enzyme, which exhibits a high stability towards organic solvents, was found to retain 73% of its activity in the presence of 30% acetone. It was determined that  $K^+$  ion increased the activity and in the presence of EDTA the enzyme stability was protected at 86%. In addition, it was identified that the  $CaCl_2$  compound increased the  $\alpha$ -amylase enzyme activity. The highest substrate specificity for the  $\alpha$ -amylase enzyme was determined as rice starch. The  $K_M$  and  $V_{max}$  values for *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amylase enzyme were respectively found to be 3,24 mg / mL and 204,08 mmol.mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>.

2017, 107 pages

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*,  $\alpha$ -amylase, starch affinity method, thermophilic bacteria, enzymatic charecterization, purification.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince bütün laboratuvar imkanlarını sağlayan, Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, tez dönemi boyunca değerli fikirlerini benimle paylaşan hocam Sayın Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na

Tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarında ve tez yazım aşamasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen iyi ve kötü her anımı paylaştığım Sayın Sümeyye AKBULUT, Sayın Yeliz DEMİR ve Sayın Esra ALÇİÇEK'e

Yine tez aşamasında laboratuvar ve tez yazımı konusunda yardım ve bilgilerini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Mustafa Özkan BALTACI'ya

Laboratuvar imkanlarını sağlayan ve bu konuda desteğini esirgemeyen Sayın Harun BUDAK ve Nurdan GÖNÜL BALTACI'ya

Tez yazım aşamasında her konuda yardımlarını esirgemeyen Sayın Halil İbrahim SEVİNÇ, Sayın Yunus Emre SARIGÜL'e

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destek ve fedakarlıklarını her zaman hissettiğim dua ve sabırlarıyla yanımda olan annem Ayşe ÖLMEZ'e, kardeşim Kevser ÖLMEZ'e teşekkürü bir borç bilirim.

**Sultan ÖLMEZ**

**Eylül, 2017**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                           |          |
|---------------------------------------------------------------------------|----------|
| ÖZET.....                                                                 | i        |
| ABSTRACT .....                                                            | ii       |
| TEŞEKKÜR.....                                                             | iii      |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                      | viii     |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                      | x        |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                   | xi       |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                      | <b>1</b> |
| 1.1. Enzimler .....                                                       | 1        |
| 1.1.1. Hayvansal kaynaklı enzimler .....                                  | 2        |
| 1.1.2. Bitkisel kaynaklı enzimler.....                                    | 2        |
| 1.1.3. Mikrobiyal kaynaklı enzimler .....                                 | 2        |
| 1.1.4. İntraselüler enzimler.....                                         | 3        |
| 1.1.5. Ekstraselüler enzimler .....                                       | 3        |
| 1.2. Amilolitik Enzimler.....                                             | 4        |
| 1.2.1. $\alpha$ -Amilaz yapısı, aktif bölgesi ve kataliz mekanizması..... | 6        |
| 1.2.2. $\alpha$ -amilaz enziminin endüstrideki kullanım alanları .....    | 9        |
| 1.2.2.a. Amilaz enziminin gıda endüstrisindeki yeri.....                  | 10       |
| 1.2.2.b. Amilaz enziminin tekstil endüstrisindeki yeri.....               | 11       |
| 1.2.2.c. Amilaz enziminin kağıt endüstrisindeki yeri.....                 | 12       |
| 1.2.2.d. Amilaz enziminin deterjan endüstrisindeki yeri.....              | 12       |
| 1.2.2.e. Amilaz enzimi için medikal ve klinik uygulamalar.....            | 12       |
| 1.2.2.f. Amilaz enzimi ile etanol üretimi.....                            | 13       |
| 1.3. Nişasta .....                                                        | 13       |
| 1.4. Termofilik mikroorganizmalar .....                                   | 15       |
| 1.4.1. <i>Bacillus</i> cinsi .....                                        | 16       |
| 1.4.1.a. <i>Bacillus licheniformis</i> .....                              | 18       |
| 1.5. Mikroorganizmalar İçin Moleküler Tanımlama Yöntemleri.....           | 18       |
| 1.5.1. 16S rRNA dizi analizi .....                                        | 18       |
| 1.5.2. Genomik parmak izi analizi .....                                   | 20       |

|                                                                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.5.3. Filogenetik analiz .....                                                                                                                              | 21        |
| 1.5.4. Klonlama .....                                                                                                                                        | 21        |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>                                                                                                                              | <b>23</b> |
| 2.1. Tezin Amacı .....                                                                                                                                       | 29        |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>                                                                                                                            | <b>31</b> |
| 3.1. Materyal.....                                                                                                                                           | 31        |
| 3.1.1. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar .....                                                                                                                  | 31        |
| 3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler .....                                                                                                                    | 32        |
| 3.1.3. Kullanılan çözeltiler .....                                                                                                                           | 34        |
| 3.2. Yöntem .....                                                                                                                                            | 35        |
| 3.2.1. Termofilik bakterilerin izolasyonu .....                                                                                                              | 35        |
| 3.2.2. Seçilen izolatların klasik yöntemlerle tanımlanması .....                                                                                             | 35        |
| 3.2.2.a. Seçilen izolatların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi .....                                                                                    | 35        |
| 3.2.2.b. Seçilen izolatların fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi .....                                                                                    | 37        |
| 3.2.2.c. Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi .....                                                                                                      | 38        |
| 3.2.3. Bakterilerin moleküler yöntemlerle tanılarının yapılması.....                                                                                         | 39        |
| 3.2.3.a. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması .....                                                                                                           | 39        |
| 3.2.3.b. rep-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi.....                                                                                 | 47        |
| 3.2.4. Ekstraselüler amilaz sentezleyen mikroorganizmaların belirlenmesi .....                                                                               | 49        |
| 3.2.5. Amilaz enzim aktivitesinin tayini.....                                                                                                                | 49        |
| 3.2.6. Glukoz standart grafiği.....                                                                                                                          | 49        |
| 3.2.7. Protein tayini .....                                                                                                                                  | 50        |
| 3.2.8. Homojenatin hazırlanması.....                                                                                                                         | 51        |
| 3.2.9. Nişasta afinite metodu ile amilaz enziminin saflaştırılması.....                                                                                      | 51        |
| 3.2.10. Diyaliz .....                                                                                                                                        | 52        |
| 3.2.11. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile<br>enzimin saflık kontrolü, molekül ağırlığının tayini ve Zimogram Analizi..... | 53        |
| 3.2.12. <i>B. licheniformis</i> SO7 $\alpha$ -amilaz enziminin biyokimyasal özelliklerinin<br>belirlenmesi .....                                             | 57        |
| 3.2.12.a. $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum pH aralığının belirlenmesi.....                                                                               | 57        |
| 3.2.12.b. $\alpha$ -amilaz enzimi için stabil pH aralığının belirlenmesi .....                                                                               | 57        |
| 3.2.12.c. $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesi .....                                                                                 | 57        |

|                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.12.d. $\alpha$ -amilaz enzimi için stabil sıcaklığın belirlenmesi .....                                      | 58        |
| 3.2.12.e. $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi.....                     | 58        |
| 3.2.12.f. $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin belirlenmesi.....                        | 58        |
| 3.2.12.g. Bazı organik çözücülerin $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesi üzerine<br>etkisinin belirlenmesi ..... | 59        |
| 3.2.12.h. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı yüzey aktif maddelerin etkisinin<br>belirlenmesi .....  | 59        |
| 3.2.12.ı. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine $\text{CaCl}_2$ etkisinin belirlenmesi.....                  | 59        |
| 3.2.12.i. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi için çeşitli substratların etkisinin belirlenmesi....                | 60        |
| 3.2.12.j. $\alpha$ -amilaz enzimi için $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin hesaplanması.....                         | 60        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>                                                                              | <b>61</b> |
| 4.1. Seçilen İzolatların Klasik Yöntemlerle Tanımlanması .....                                                   | 61        |
| 4.1.1. Seçilen izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin<br>belirlenmesi.....            | 61        |
| 4.2. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması .....                                                                   | 62        |
| 4.2.1. Genomik DNA izolasyonu .....                                                                              | 62        |
| 4.2.2. 16S rRNA PCR işlemi.....                                                                                  | 62        |
| 4.2.3. Amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması.....                                                 | 62        |
| 4.2.4. Koloni PCR .....                                                                                          | 63        |
| 4.2.5. Plazmit izolasyonu .....                                                                                  | 64        |
| 4.2.6. DNA dizi analiz sonuçları .....                                                                           | 64        |
| 4.3. rep-PCR Yöntemiyle Bakterilerin Gen Profillerinin Belirlenmesi .....                                        | 66        |
| 4.3.1. BOX-PCR.....                                                                                              | 66        |
| 4.3.2. (GTG) <sub>5</sub> -PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi.....                       | 67        |
| 4.4. Katı Besiyerinde Ekstraselüler Amilaz Sentezleyen Bakterilerin Seçimi.....                                  | 68        |
| 4.5. Amilaz Aktivitesinin Tayini .....                                                                           | 69        |
| 4.6. Glukoz Standart Grafiğinin Oluşturulması.....                                                               | 69        |
| 4.7. Protein Tayini .....                                                                                        | 69        |
| 4.8. Amilaz Enziminin Farklı Ham Nişastalara Tutunma Yeteneğinin Araştırılması                                   | 70        |
| 4.9. Amilaz Enziminin Saflaştırılması .....                                                                      | 71        |
| 4.10. SDS-PAGE ve Zimogram Analizi .....                                                                         | 71        |

|                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.11. <i>B. licheniformis</i> $\alpha$ -Amilaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi..... | 73        |
| 4.11.1. $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum pH değeri ve aralığının belirlenmesi.....                 | 73        |
| 4.11.2. $\alpha$ -amilaz enziminin pH kararlılığının belirlenmesi .....                                | 74        |
| 4.11.3. $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesi .....                             | 75        |
| 4.11.4. $\alpha$ -amilaz enzimi için stabil sıcaklığın belirlenmesi .....                              | 76        |
| 4.11.5. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi .....  | 77        |
| 4.11.6. Bazı inhibitörlerin amilaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....                      | 78        |
| 4.11.7. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi.....                 | 80        |
| 4.11.8. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı yüzey aktif maddelerin etkisi.....              | 81        |
| 4.11.9. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine $\text{CaCl}_2$ etkisi .....                         | 82        |
| 4.11.10. $\alpha$ -amilaz enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi.....                            | 83        |
| 4.11.11. $\alpha$ -amilaz enziminin $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin hesaplanması.....                  | 84        |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>                                                                       | <b>86</b> |
| KAYNAKÇA.....                                                                                          | 97        |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                         | 108       |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                   |                                                |
|-------------------|------------------------------------------------|
| AA                | : Akrilamid                                    |
| APS               | : Amonyum Persülfat                            |
| Bis - AA          | : Bis Akrilamid                                |
| BSA               | : Sığır Serum Albumin                          |
| CaCl <sub>2</sub> | : Kalsiyum Klorür                              |
| dk                | : Dakika                                       |
| DMSO              | : Dimetilsülfoksit                             |
| DNA               | : Deoksiribonükleik Asit                       |
| DNS               | : Dinitrosalisilik Asit                        |
| DNTB              | : Dinitrotriyo Benzen                          |
| EDTA              | : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit              |
| EtOH              | : Etanol                                       |
| EU                | : Enzim Ünitesi                                |
| g                 | : Gram                                         |
| HCl               | : Hidroklorik Asit                             |
| IPTG              | : izopropil $\beta$ -D-1- tiyogalaktopiranosid |
| L                 | : Litre                                        |
| M                 | : Molar                                        |
| mg                | : Miligram                                     |
| mL                | : Mililitre                                    |
| mM                | : Milimolar                                    |
| NaOH              | : Sodyum Hidroksit                             |
| nm                | : Nanometre                                    |
| °C                | : Santigrat Derece                             |
| OD                | : Optik Dansite                                |
| PCR               | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu                  |
| PMSF              | : Fenil Metil Sülfonil Florid                  |
| rDNA              | : Ribozomal DNA                                |
| RNA               | : Ribonükleik Asit                             |

|            |                                  |
|------------|----------------------------------|
| RNaz       | : Ribonükleaz Enzimi             |
| rpm        | : Dakikadaki dönüş sayısı        |
| SDS        | : Sodyum Dodesil Sülfat          |
| sn         | : Saniye                         |
| TEMED      | : N,N,N',N'-tetrametiletildiamin |
| Tris – HCl | : Trizma Tamponu                 |
| TSA        | : Triptone Soy Agar              |
| TSB        | : Triptone Soy Broth             |
| V          | : Volt                           |
| $\alpha$   | : Alfa                           |
| $\beta$    | : Beta                           |
| $\mu$ l    | : Mikrolitre                     |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. <i>B. licheniformis</i> $\alpha$ -amilaz üç boyutlu yapısı .....                                                                                                           | 7  |
| Şekil 1.2. Nişastanın bileşenleri; a) Amiloz b) Amilopektin .....                                                                                                                     | 13 |
| Şekil 3.1. SO7 $\alpha$ -amilaz enzimi saflaştırma prosedürü.....                                                                                                                     | 52 |
| Şekil 4.1. 16S rRNA PCR jel görüntüsü.....                                                                                                                                            | 62 |
| Şekil 4.2. Mavi beyaz koloni tarama .....                                                                                                                                             | 63 |
| Şekil 4.3. Koloni PCR örnek jel görüntüsü.....                                                                                                                                        | 64 |
| Şekil 4.4. Nevşehir Kozaklı termal kaplıca su örneğinden izole edilen suşların 16S<br>rRNA gen analiz sonuçları esas alınarak oluşturulan Neighbor-joining<br>filogenetik ağacı. .... | 66 |
| Şekil 4.5. Örneklerle ait BOX-PCR jel görüntüsü.....                                                                                                                                  | 67 |
| Şekil 4.6. Bazı örneklerle ait (GTG) <sub>5</sub> -PCR jel görüntüsü.....                                                                                                             | 68 |
| Şekil 4.7. <i>B. licheniformis</i> SO7 suşunun amilolitik petri testi görüntüsü.....                                                                                                  | 68 |
| Şekil 4.8. Glukoz standart grafiği .....                                                                                                                                              | 69 |
| Şekil 4.9. Protein standart grafiği .....                                                                                                                                             | 70 |
| Şekil 4.10. Amilaz enziminin farklı nişastalara tutunma yüzdesi.....                                                                                                                  | 71 |
| Şekil 4.11. SDS-PAGE sonucu çizilen log MA-R <sub>f</sub> grafiği .....                                                                                                               | 72 |
| Şekil 4.12. SDS-PAGE ve zimogram analiz görüntüsü.....                                                                                                                                | 73 |
| Şekil 4.13. <i>B. licheniformis</i> SO7 $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH grafiği.....                                                                                            | 74 |
| Şekil 4.14. 4°C ve 55°C’de pH’nın $\alpha$ -amilaz enzim kararlılığı üzerine etkisi .....                                                                                             | 75 |
| Şekil 4.15. $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesi.....                                                                                                         | 76 |
| Şekil 4.16. Sıcaklığın $\alpha$ -amilaz enzim kararlılığı üzerine etkisi.....                                                                                                         | 77 |
| Şekil 4.17. Bazı metal iyonlarının amilaz aktivitesi üzerine etkisi.....                                                                                                              | 78 |
| Şekil 4.18. <i>B.licheniformis</i> SO7’den elde edilen amilaz enzimi üzerine inhibisyon<br>ajanlarının etkisi .....                                                                   | 79 |
| Şekil 4.19. Bazı organik çözücülerin amilaz aktivitesi üzerine etkisi .....                                                                                                           | 81 |
| Şekil 4.20. Deterjanların $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine etkisi .....                                                                                                            | 82 |
| Şekil 4.21. $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine CaCl <sub>2</sub> etkisi .....                                                                                                        | 83 |
| Şekil 4.22. $\alpha$ -amilaz enziminin substrat spesifitesi.....                                                                                                                      | 84 |
| Şekil 4.23. <i>B. licheniformis</i> SO7 $\alpha$ -amilazı için Lineweaver-Burk grafiği.....                                                                                           | 85 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1. Amilolitik enzimler.....                                                                            | 5  |
| Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazlar.....                                                 | 31 |
| Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar.....                                                                         | 32 |
| Çizelge 3.3. Tez kapsamında deneylerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....                                | 34 |
| Çizelge 3.4. 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin konsantrasyonları ve miktarları.....                 | 41 |
| Çizelge 3.5. Glukoz standardının tüplere dağılımı .....                                                          | 50 |
| Çizelge 4.1. İzolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları.....                              | 61 |
| Çizelge 4.2. DNA dizi analizi sonucu belirlenen bakterilerin benzerlik yüzdeleri ve genbank numaraları.....      | 65 |
| Çizelge 4.3. <i>B. licheniformis</i> SO7 $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılması .....                        | 71 |
| Çizelge 4.4. Bazı metal iyonlarının amilaz aktivitesi üzerine etkisi.....                                        | 78 |
| Çizelge 4.5. <i>B.licheniformis</i> SO7'den elde edilen amilaz enzimi üzerine inhibisyon ajanlarının etkisi..... | 79 |
| Çizelge 4.6. Bazı organik çözücülerin amilaz aktivitesi üzerine etkisi. ....                                     | 80 |
| Çizelge 4.7. Deterjanların $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine etkisi .....                                      | 81 |
| Çizelge 4.8. $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine $\text{CaCl}_2$ etkisi. ....                                    | 82 |

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Enzimler

Enzimler, büyük bir kısmı protein yapısında olan ve hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen biyomoleküllerdir. Enzimler kataliz faaliyetleri için, kofaktör ya da koenzim olarak bilinen protein yapısında olmayan moleküllere ihtiyaç duyabilirler (Mojsov 2012). Bazı enzimler apoenzim (protein kısmı) ve koenzim (organik veya inorganik kısım) olmak üzere iki farklı bölümden oluşur. Enzim kofaktör yapısı ile aktif ise “Holoenzim” adını alır. Örneğin tükürükte bulunan amilaz enzimi nişastayı  $Cl^-$  iyonlarının bulunduğu ortamda parçalar. Koenzim  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  gibi iyonlardan meydana geldiğinde kofaktör olarak adlandırılır. Koenzim bölümü organik yapıda ve apoenzime kovalent bağ ile bağlanmışsa prostetik grup olarak tanımlanır (Aygan 2008).

Enzimler EC kodu ile başlayan 4 numara ile ifade edilir. İlk numara katalitik fonksiyonun gerçekleştiği enzim sınıfını, ikinci numara enzimin etkileşime girdiği kimyasal yapı ve fonksiyonel grubu, üçüncü numara akseptörü, dördüncü numara ise enzimin ait olduğu sınıftaki sıra numarasını ifade eder.

Endüstriyel enzimlerin maliyet bakımından ucuz olması, farklı alanlarda kullanılabilme özelliğini taşıması ayrıca alerjik ya da toksik olmaması, güvenilirlik gibi özelliklere sahip olması istenir (Baltaş 2012). Endüstriyel enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidratazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'luk dilimi ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Deterjan (%37), tekstil (%12), nişasta (%11), fırıncılık (%8) ve havyan yemi üretimi (%6) enzimlerin kullanıldığı temel endüstriyel alanlardır (Schallmeyer *et al.* 2004), (Das *et al.* 2011).

Karbohidratazlar içerisinde yer alan  $\alpha$ -amilaz enzimi ise endüstriyel alanda %13'lük bir paya sahiptir.  $\alpha$ -amilaz enzimi, ticari olarak kullanılan ilk enzimdir. 1939 yılında Japonya'da *Bacillus subtilis* suşundan izole edilen  $\alpha$ -amilaz enzimi ilk kez endüstriyel

boyutlarda üretilmiştir. *B.subtilis* ve *B.licheniformis* bakterileri 1970’de  $\alpha$ -amilaz enzim üretimi için yoğun şekilde tercih edilmiştir.  $\alpha$ -amilazlar önemli endüstriyel enzimlerden olup gıda, meyve suyu, deterjan üretimi, eczacılık ve tekstil endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Baltaş 2012).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin geneli mikroorganizma esaslıdır bunun yanı sıra bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimler de tercih edilebilmektedir (Tatar 2007).

#### **1.1.1. Hayvansal kaynaklı enzimler**

Hayvanlardan elde edilen enzimler çoğunlukla tavuk yumurtasının beyazı, domuz midesi, pankreas, geviş getiren hayvanların karın bölgesinden izole edilerek pek çok endüstriyel alanda olduğu gibi yiyeceklerin hazırlanmasında da kullanılmaktadır (Tatar 2007).

#### **1.1.2. Bitkisel kaynaklı enzimler**

Genellikle yenilebilir bitkilerden elde edilen enzimler tercih edilmektedir. Bunun nedeni ise bu bitkilerin toksik olmamasıdır. Bu sınıftaki en önemli enzim arpa tohumlarından izole edilen malt amilazdır. Malt amilazı bira üretimi ve ekmek yapımında kullanılmaktadır (Tatar 2007).

#### **1.1.3. Mikrobiyal kaynaklı enzimler**

Endüstriyel kaynaklı enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Amilaz enziminin elde edilmesinde mikroorganizma esaslı prosesler diğer kaynaklara göre daha etkilidir. Bunun nedeni mikroorganizma temelli proseslerin tekniğinin kolay, maliyetinin düşük ve hızlı olmasıdır. Ayrıca enzimle ilgili istenilen özelliklerin temin edilebilmesine de olanak sağlamaktadır. Amilazlar, biyoteknolojik araştırmalarda hayati bir rol oynarlar ve dünya enzim pazarında (%25-%33) önemli bir orana sahiptirler (Sen

*et al.* 2014). Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, bitkisel yada hayvansal esaslı enzimlere göre katalitik aktivite bakımından daha yüksektir bunun yanı sıra istenmeyen yan ürün oluşumu yoktur, daha kararlı, ucuz ve bol miktarda üretilmektedirler (Baltaş 2012). Mikrobiyal enzimler bazı özel mikroorganizmalardan elde edilirler. Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme kabiliyetlerine göre değil, ayrıca mikroorganizmaların toksik ve patojen olup olmamasına göre de ayrılırlar. Genelde sıkça kullanılan mikrobiyal enzimler  $\alpha$ -amilaz, glikoamilaz, glikoizomeraz ve proteaz enzimleridir.

Enzimler hücre içerisinde salgılanma şekillerine göre de intraselüler ve ekstraselüler olarak sınıflandırılırlar.

#### **1.1.4. İntraselüler enzimler**

İntraselüler enzimler, sitoplazmada yer alan ribozomlarda üretilirler. Genellikle intraselüler enzimlerin substratları şekerler, aminoasitler, karboksilik asitler gibi molekül ağırlığı küçük olan ve hücre zarından kolay geçebilen moleküllerdir (Tatar 2007).

#### **1.1.5. Ekstraselüler enzimler**

Ekstraselüler enzimler, hücrelerin dış bölgeleri ile bağlantılı olan enzimler olarak tanımlanır (Tatar 2007).

Ekstraselüler enzimlerin kararlılık seviyesi intraselüler enzimlere göre daha yüksektir ve çevresel şartlara bağlı olarak aktivitelerini uzun süre koruyabilirler (Tatar 2007). Gram negatif bakterilerden biri olan *Escherichia coli*'nin proteinleri iç ve dış membran arasındaki periplazmik boşluğa salgılanır. Gram negatif bakterilerde, gram pozitif bakterilerde bulunmayan bir dış membran vardır. Bu yüzden gram pozitif bakterilerde enzimler direct olarak besiyerine salınır.

## 1.2. Amilolitik Enzimler

Hidroliz ve modifikasyon amacıyla enzimlerin en çok kullanıldığı alanlardan bir tanesi de nişasta endüstrisidir. Nişasta polimerinin benzer yapıdaki diğer polimerler gibi tamamının hidroliz olması için enzim kombinasyonlarına ihtiyaç duyulur. Endüstride nişasta hidrolizinde kullanılan 5 enzim grubu vardır. Bu enzimler;

1. Endo-amilazlar (iç etkili)
2. Ekzo-amilazlar (dış etkili)
3. Dallanmayı kırıcı enzimler
4. İzomerazlar
5. Transferazlar

Bunlar  $\alpha$ -amilaz, glukoamilaz, veya  $\beta$ -amilaz ve izoamilaz veya pullulanazdır (Baltaş 2012). En fazla bilinen amilolitik enzimler  $\alpha$ -amilaz (EC 3.2.1.1),  $\beta$ -amilaz (EC 3.2.1.2) ve glukoamilazdır (EC 3.2.1.3). Bu enzimlerin primer ve tersiyer yapıları birbirlerinden farklıdır. Ayrıca kataliz merkezleri ve reaksiyon mekanizmaları da birbirlerinden farklıdır (Janeček 2009). Amilolitik enzimlerin enzim kod numaraları (EC numaraları) ve başlıca substratları; Çizelge 1.1’de verilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Amilolitik enzimler (Reddy *et al.* 2003; Mojssov 2012).

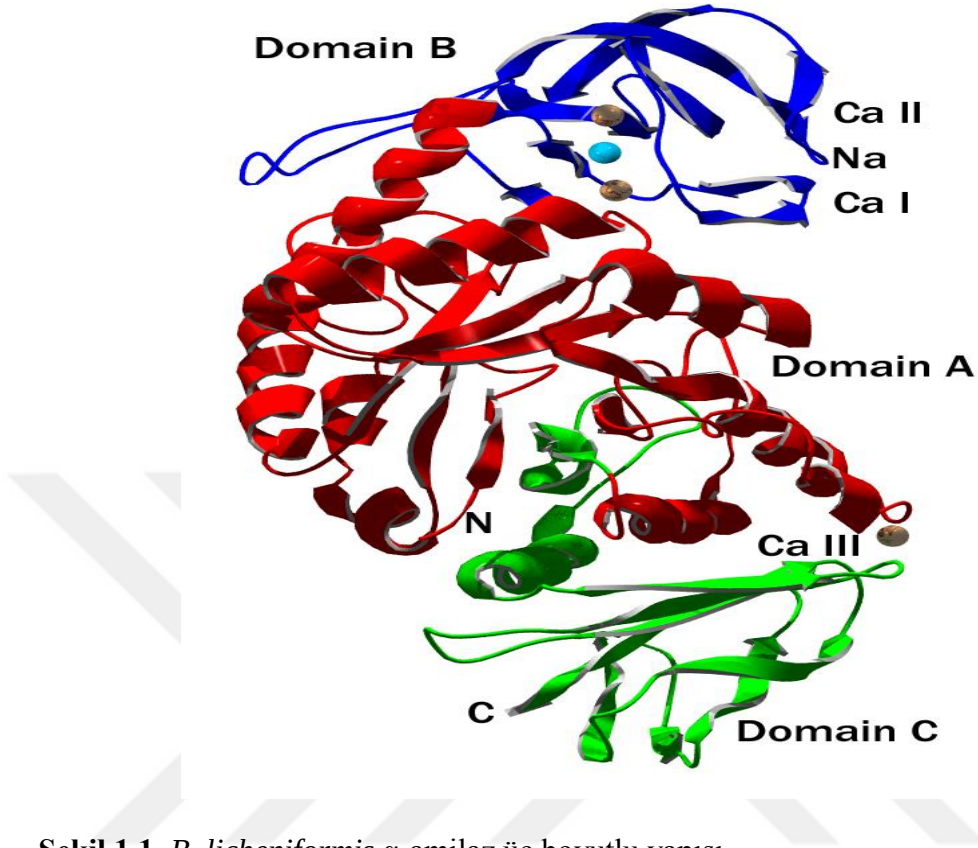
| Enzim                             | EC Numarası | Başlıca substratı         |
|-----------------------------------|-------------|---------------------------|
| Amilosükraz                       | 2.4.1.4     | Sükroz                    |
| Sükroz fosforilaz                 | 2.4.1.7     | Sükroz                    |
| Glukon dallanma enzimi            | 2.4.1.18    | Nişasta, glikojen         |
| Siklodekstrin glikozil transferaz | 2.4.1.19    | Nişasta                   |
| Amilomaltaz                       | 2.4.1.25    | Nişasta, glikojen         |
| Amilopentoz oluşturan amilaz      | 3.2.1.-     | Nişasta                   |
| $\alpha$ - Amilaz                 | 3.2.1.1     | Nişasta                   |
| Oligo (1-6)glukozidaz             | 3.2.1.10    | Amilopektin               |
| $\alpha$ - Glukozidaz             | 3.2.1.20    | Nişasta                   |
| Amilopullulanaz                   | 3.2.1.41    | Pullulan                  |
| Siklomaltodekstrinaz              | 3.2.1.54    | Siklodekstrinler          |
| Izopullulanaz                     | 3.2.1.57    | Pullulan                  |
| Izoamilaz                         | 3.2.1.68    | Amilopektin               |
| Maltotetroz oluşturan amilaz      | 3.2.1.60    | Nişasta                   |
| Siklodekstranaz                   | 3.2.1.70    | Nişasta                   |
| Teraloz 6-fosfat hidrolaz         | 3.2.1.93    | Teraloz                   |
| Maltoheksoz oluşturan amilaz      | 3.2.1.98    | Nişasta                   |
| Maltojenik amilaz                 | 3.2.1.133   | Siklodekstrinler, nişasta |
| Neopullulanaz                     | 3.2.1.135   | Pullulan                  |
| Malto-oligozil teralaz hidrolaz   | 3.2.1.141   | Teraloz                   |
| Malto-oligozil teralaz sentaz     | 5.4.99.15   | Maltoz                    |

İki iyi bilinen amilolitik enzim olan Termamyl ve Fungamyl ticari olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler farklı seviyelerde dekstroz içeren şurupların ve glukoz şurubunun üretilmesinde kullanılmaktadırlar (Chitradon *et al.* 2000).

### 1.2.1. $\alpha$ -Amilaz yapısı, aktif bölgesi ve kataliz mekanizması

$\alpha$ -amilaz (EC 3.2.1.1, 1-4- $\alpha$ -glukan glukanohidrolaz) hidrolaz sınıfına ait bir enzimdir. *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilaz enzimini kodlayan genin yaklaşık 1845 bp olduğu ve 613 aminoasitlik protein kodlayan bir bölgeye sahip olduğu bildirilmiştir (Lo *et al.* 2001).  $\alpha$ -amilaz (EC 3.2.1.1) enziminin nişastayı hidrolize etmesi ile serbest kalan hemiasetal gruplar  $\alpha$ -optik konformasyonda oldukları için bu enzimlere genellikle  $\alpha$ -amilazlar denilmektedir (Baltaş 2012).

*B. licheniformis*  $\alpha$ -amilaz enzimi aile üyeleri için tanımlanan domainler; A, B, C, D ve E'dir. En iyi korunmuş domain TIM barrel'i içeren A domainidir. A bölgesi ailenin diğer üyelerinde de olduğu gibi ( $\alpha/\beta$ ) 8 tabaka yapısından oluşmuştur. B domaininin işlevi tam olarak bilinmemektedir. Ancak kalsiyum bağlanmasında rol alan bir korunmuş bölgeye sahiptir. B bölgesi TIM barrel yapısının üç sarmal ve üç plaka formu arasında yer alır (Nielsen and Borchert 2000; Reddy *et al.* 2003). Genel olarak B bölgesinin uzunluğu 44 ile 133 aminoasit arasında değişir. B bölgesi zengin  $\beta$  yapısında ve düzensizdir. B domaini yapı ve büyüklük olarak  $\alpha$ -amilaz enzim ailesinde önemli derecede farklılık gösterir. Bu da B domaininin  $\alpha$ -amilazlar arasında substrat özgüllüğündeki farklılığı ve stabiliteyi etkilediğini düşündürmektedir. C bölgesi A bölgesine basit bir polipeptid zinciriyle bağlanmıştır ve  $\beta$  kırmalı tabakadan oluşmaktadır. C domaini üzerinde yapılan mutasyonlar sonucu bu bölümün aktivite üzerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. D domaininin işlevi tam olarak anlaşılamamıştır ancak E domainine substrat bağlanması sırasında eşlik ettiği düşünülmektedir. E domaini ise nişastanın bağlanmasında görev almaktadır (Baltaş 2012; D'Amico *et al.* 2000; Kaur and Sharma 2006).



**Şekil 1.1.** *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilaz üç boyutlu yapısı

\**B. licheniformis*  $\alpha$ -amilazının üç boyutlu yapısı  $\alpha$ -sarmal ve  $\beta$  kırmal tabakadan oluşan A bölgesi kırmızı renkte, B bölgesi mavi renkte, C bölgesi yeşil renkte, sodyum iyonlar açık mavi ve kalsiyum iyonları altın renginde gösterilmiştir (Nazmi *et al.* 2006).

$\alpha$ -amilaz enzimi metalloprotein yapısındadır ve aktivite gösterebilmek için kalsiyum ( $\text{Ca}^{2+}$ ) iyonuna ihtiyaç duymaktadır (Tatar 2007).  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu A ile B bölgesinin arasında yer alır, hem allosterik aktivatör olarak iş görür hem de katalitik bölgenin yapısının korunmasında görev alır (Muralikrishna and Nirmala 2005).

Kalsiyum iyonları, aktif bölgeye çok uzak olmalarına rağmen, kataliz olayında yapısal önem taşımaktadır.  $\alpha$ -amilaz enzim bünyesinde bir veya daha fazla kalsiyum iyonu yer alabilir (Nielsen and Brochert 2000). Kalsiyum molekülleri pepsin, tripsin, papain gibi proteazlar, ekstrem pH ve sıcaklıklara karşı da enzimin yapısal olarak daha dayanıklı olmasını sağlamaktadır (Tatar 2007).

$\alpha$ -amilaz enzimleri nişastanın hidroliz olma derecesine göre iki sınıfa ayrılırlar. Nişastayı sıvı hale getiren  $\alpha$ -amilaz enzimleri nişastanın %30 ile %40'ını; nişastayı şekere dönüştüren  $\alpha$ -amilazlar ise nişastanın %50-%60'ını hidroliz etmektedir (Tatar 2007).  $\alpha$ -amilaz ailesinin birçok üyesi ( $\alpha/\beta$ ) 8 katlanmalı çoklu altbirimlerden oluşur. Bu da substrat özgüllüğü için geniş bir yelpazede yapısal esneklik sağlar (Baltaş 2012).  $\alpha$ -amilaz ailesinin üyelerinin primer yapıları kıyaslandığında ilgili enzimlerin geniş bir sıra çeşitliliğinin olduğu bunun yanı sıra oldukça korunmuş 4 kısa ( $\alpha/\beta$ ) katlanmalı katalitik bölgeye sahip oldukları belirlenmiştir.

Endo amilazlara ek olarak, transglikozilasyon aktivitesine sahip, siklodekstrin glikoztransferaz (CGTaz) (EC 2.4.1.19); maltojenik amilaz (EC 3.2.1.133) ve maltooligosakkarit oluşturan amilazlar (maltotetroz ve maltohegzoz oluşturan amilazlar) bulunmaktadır (Van der Maarel *et al.* 2002).

Ekzo amilazlar oligo ve/veya monosakkaritler oluştururlar. Ekzo amilazlardan  $\beta$ -amilaz (EC 3.2.1.2) yalnızca  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağları parçalarken, amiloglukozidaz (glukoamilaz (EC 3.2.1.3)) ve  $\alpha$ -glukozidaz (EC 3.2.1.20),  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 glikozid bağlarının her ikisini de hidrolizleyebilir. Ekzo amilazlar, amilozun ve amilopektinin dış glukoz birimlerine karşı aktivite gösterdiklerinden yalnızca glukoz, maltoz ve  $\beta$ -dekstrinlerin oluşumunu sağlarlar. Ayrıca,  $\beta$ -amilaz ve glukoamilaz enzimleri, serbest maltoz birimlerinin anomerik konfigürasyonlarını  $\alpha$ 'dan  $\beta$ 'ya çevirebilirler (Pandey *et al.* 2000). Ayrıca siklodekstrinaz (CDaz), maltojenik amilaz ve neopullulanazın bu aileye dahil olduğu belirlenmiştir.

$\alpha$ -amilaz enzimi yaşayan tüm organizmalarda bulunur. Enzimin substrat özgüllüğü türden türe hatta dokudan dokuya farklılık gösterir. Genellikle en yüksek özgüllük nişastaya daha sonra sırasıyla amiloz, amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioza karşıdır (Gupta *et al.* 2003). İnsanlarda amilaz enziminin iki izoformu mevcuttur; bunlar aktif bölgedeki bazı amino asitlerin yer değiştirmelerinden dolayı farklı aktiviteye sahip olan tükürük amilazı (pityalin) ve pankreatik amilazdır (McDowall 2006).

Gerekli koşullar sağlandıktan sonra kısa sürede elde edildikleri için  $\alpha$ -amilazların temel kaynağını mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Termostabilite açısından bakteriyel  $\alpha$ -amilazlar fungal  $\alpha$ -amilazlara göre daha kararlıdır. Nişastanın tamamiyle hidroliz olabilmesi için prejelatinizasyon olayı gereklidir. Bakteriyel  $\alpha$ -amilaz enzimi jelatinize hale gelmiş olan nişasta moleküllerini normal nişastaya oranla 300, mantar  $\alpha$ -amilazı ise 100 kat daha hızlı parçalar (Tatar 2007).

Termoasidofilik ve alkalifilik bakterilerden izole edilen enzimler genellikle ekstrem pH ve sıcaklık çalışmaları için kullanılır. Düşük pH ve yüksek sıcaklık değerlerinde aktif olmanın yanı sıra sıcaklık kararlılığı nişasta işlenmesinde kullanılan  $\alpha$ -amilazlar için önemli bir diğer noktadır (Dheeran *et al.* 2010). *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens*'in yüksek sıcaklık kararlılığı olan  $\alpha$ -amilazlar ürettiği uzun yıllardan beri bilinmektedir (Haki and Rakshit 2003). 80°C-90°C optimum aktivite sergileyen  $\alpha$ -amilaz enzimleri termofilik *B.licheniformis* türünden elde edilmektedir.

*B. licheniformis* suşundan elde edilen  $\alpha$ -amilazın aktif bölgesinin alt kısmında yani alt birimin N-terminal bölgesiyle sınırlı ve diğer alt birimin ( $\alpha/\beta$ ) 8 katlanmasının olduğu bölgede ekstra bir boşluk olduğu gözlenmiştir (Baltaş 2012). Buradaki boşluk (ekstra şeker bağlanma bölgesi olarak tanımlanır), mono veya disakkaritlerin yerleşmesi için uygun bir bölgedir ve alıcı birim olarak suyla yarışarak substrata saldırır.

### 1.2.2. $\alpha$ -amilaz enziminin endüstrideki kullanım alanları

Ticari olarak kullanılan ilk enzim  $\alpha$ -amilaz enzimidir (Tatar 2007).  $\alpha$ -amilaz enzimi yüksek sıcaklıklara karşı adapte olabilme özelliğini genetik olarak taşımaktadır. Termostabil yapıdaki  $\alpha$ -amilaz kullanımı ile endüstriyel proseslerde yüksek sıcaklık, bakteriyel ve viral kontaminasyon riski en aza indirgenmiş olur (Fujiwara 2002). Biyofiziksel ve yapısal çalışmaların sonuçlarına göre, enzim yapısındaki adaptasyonun bir dizi modifikasyon olayı sonrasında ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu değişiklik sonrası termal stabilitenin arttığı proteinlerin rijit ve dayanıklı hale geldiği bildirilmiştir (Eichler 2001). Termostabil  $\alpha$ -amilaz enzimleri termal dayanıklılık ve aktivite için

kalsiyum iyonlarına ihtiyaç duymaz. Bu da termostabil amilazları mezofilik  $\alpha$ -amilazlardan ayıran önemli bir noktadır (Şimşek 2006).

Bazı endüstriyel enzimlerin eldesinde mikroorganizmaların önemli etkileri söz konusudur. 2010 yılı dünya pazarında endüstriyel enzimlerin payı 2 milyar dolar olarak belirtilmiş ve yıllık %3.3 oranında büyüme sağlaması öngörülmüştür (Naidu and Saranraj 2013). Amilaz enzimleri biyoteknolojide önemli bir yere sahiptir ve dünya enzim pazarının yaklaşık %25'ini oluşturmaktadırlar (Nguyen *et al.* 2002; Reddy *et al.* 2003; Rajagopalan and Krishnan 2008). Amilaz enzimi ekmek, pastacılık, bira, peynir gibi gıda endüstrilerinde, nişastanın maltoza hidrolize olmasında, maltoz şuruplarının eldesinde ve deterjan üretiminde kullanılmaktadır (Tatar 2007). Gıda endüstrisinde yiyeceklerin kalitesinin artırılmasında ve tatlandırmada (Tatar 2007), tekstil endüstrisinde haşıl alma işleminde ve alkol fermentasyonunda yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Tatar 2007). Yine kağıt endüstrisinde de geniş ölçüde kullanılmaktadır (Baltaş 2012).

*Bacillus* sp. ve *Aspergillus* sp.'den elde edilen amilaz ve  $\beta$ -glukanaz enzimleri bira üretimi, fırıncılık ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır.

#### **1.2.2.a. Amilaz enziminin gıda endüstrisindeki yeri**

Gıdaların işlenmesi için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır.  $\alpha$ -amilaz enziminin gıda endüstrisindeki kullanımı ise oldukça eskiye dayanır.  $\alpha$ -amilaz nişastanın sıvılaştırılmasında kullanılır. Dekstrin nişastanın glikoza hidrolizasyonu sırasında oluşan kısa yapıdaki ilk moleküldür. Dekstrin molekülü çözünürlüğü yüksek ve dayanıklı yapıda yoğun şurup kıvamındadır. Özellikle gıdalarda viskozite arttırıcı dolgu maddesi olarak kullanılır (Tatar 2007).

Dekstrin moleküllerine kadar hidrolize olan nişastada glikoamilaz enziminin ortama ilave edilmesiyle glukoz molekülleri açığa çıkar. Elde edilen glukoz şurup halinde veya kristal toz şeklindedir. Glukoz şurubu glukoz izomeraz enzimi ile muamele edildiğinde

ise fruktoz şurubu elde edilir. Fruktoz şurubu gıda endüstrisinde özellikle tatlandırıcı olarak kullanılır.

Nişastanın  $\alpha$ -amilaz enzimi ile sıvılaştırılmasının ardından izoamilaz ve pullulanaz enzimleri ile maltoz molekülleri açığa çıkar. Oldukça saf şekilde elde edilen yüksek orandaki maltoz; reçel, şekerleme, ekmek ve bira üretiminde kullanılır. Ayrıca gıdaların içerisine tatlandırıcı olarak da katılabilmektedir. Maltotetroz ise yan ürün olarak açığa çıkar ve gıdalarda bozunma sürecini geciktirici nem tutucu olarak kullanılır.

Mikroorganizmalardan elde edilen  $\alpha$ -amilazlar yüzyıllardır ekmeğin kabartılmasında kullanılmıştır.  $\alpha$ -amilazlar ekmeğin rengini, yumuşaklığını ve kabarma hacmini arttırmada kullanılır (Baltaş 2012). Ayrıca ekmekçilikte ekmeğin raf ömrünün uzatılmasında da  $\alpha$ -amilazlar kullanılmaktadır. Ekmek unundaki nişasta  $\alpha$ -amilaz enzimi ile dekstrinlere parçalanır. Dekstrinler mayalar tarafından fermente edilirler ve raf ömrü daha uzun daha kaliteli ekmekler elde edilir. Ekmek üretiminde genellikle fungal amilazlar (*Aspergillus* sp.) tercih edilir.

Meyve suyu üretiminde meyveler olgunlaşmadan toplandığında yapısındaki nişastadan ötürü meyve suyunda bulanıklık meydana gelir. Özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında  $\alpha$ -amilaz tercih edilir (Baltaş 2012).

### **1.2.2.b. Amilaz enziminin tekstil endüstrisindeki yeri**

İlk kez 1905’de Japonya’da tekstil endüstrisinde haşıl alma işleminde kullanılmıştır. Tekstil endüstrisinde dokuma esnasında ipliklerin sağlam ve düzgün olabilmesi adına iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilir. Bu işleme haşıllama adı verilir. Kumaşın dokunma işlemi tamamlandıktan sonra kumaşta kalan fazla nişastasının alınması gerekir. Bu işleme haşıl alma denir. Haşıl alma işlemi sırasında  $\alpha$ -amilaz enzimi nişasta giderici olarak kullanılır (Baltaş 2012).

### 1.2.2.c. Amilaz enziminin kağıt endüstrisindeki yeri

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde enzimlerin kullanımı ile ilgili çalışmalar oldukça artmıştır (Karademir *et al.* 2002). Nişasta, kağıt endüstrisinde kağıdın kaplanması (aharlaştırma) sırasında işlem boyunca meydana gelebilecek mekanik zararlara karşı koruyucudur (Hussain *et al.* 2013). Doğal nişastanın sahip olduğu viskozite kağıdın kaplanması için çok yüksektir. Bunun için istenilen yapıda nişasta eldesinde  $\alpha$ -amilazlar kullanılmaktadır (Baltaş 2012). Daha kuvvetli ve sert kağıtların eldesinde kağıda aharlaştırma işlemi uygulanır. Üretimi bitmiş olan kağıtların kalitesinin artırılmasında, silinebilme özelliğinin düzeltilmesinde ve kağıdın iyi bir biçimde kaplanmasında amilaz enzimi kullanılır.

### 1.2.2.d. Amilaz enziminin deterjan endüstrisindeki yeri

Alkalifilik *Bacillus* türleri alkalifiller arasında en çok bilinen organizmalardır. Nötrofilik özelliğe sahip  $\alpha$ -amilaz enzimleri genellikle pH 5,0-7,5 aralığında optimum aktiviteye sahiptir. Alkali özellikteki canlılardan elde edilen  $\alpha$ -amilaz enzimi ise genellikle pH 8,0-11,0 aralığında aktivite göstermektedir. Alkali özellikteki  $\alpha$ -amilaz enzimi özellikle deterjan üretiminde kullanılmaktadır.  $\alpha$ -amilaz enzimi 1975'den bu yana toz çamaşır deterjanlarında kullanılmaktadır. Mevcut olan sıvı deterjanların %90'ı  $\alpha$ -amilaz enzimi içermekte ve bu konuyla alakalı talep her geçen gün artmaktadır (Gupta *et al.* 2003). Bunun yanı sıra alkali amilazlar kuru temizleme gibi alanlarda da faaliyet göstermektedir (Baltaş 2012).

### 1.2.2.e. Amilaz enzimi için medikal ve klinik uygulamalar

Amilolitik enzim inhibitörleri şeker moleküllerinin metabolik hastalıklardaki işlevinin anlaşılması ve yeni ilaçların eldesinde merak uyandıran bir konudur (Kandra 2003). Amilaz enzimi, tükrük bezi, pankreatik hastalıkların (parotitis, akut pankreatitis) tedavisinde indikatör görevine sahiptir. Bunun dışında  $\alpha$ -amilaz enzimleri hiperlipemia, obezite ve diyabet gibi hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır.

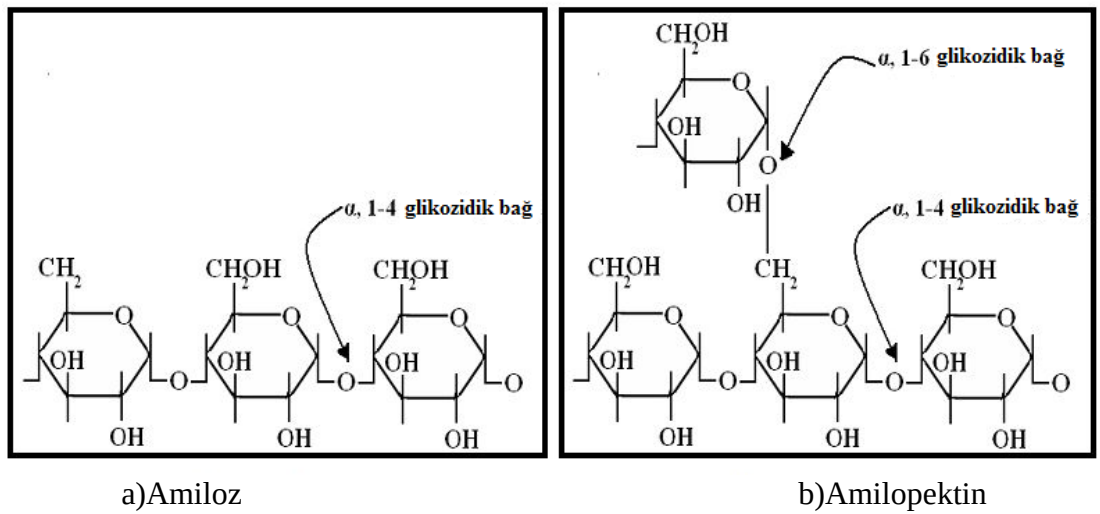
$\alpha$ -amilaz enzimi uzun moleküllü oligosakkaritlerin tespit edilmesinde gümüş nitrat testine göre daha başarılıdır (Giri *et al.* 1990). Ayrıca amilazlar elektrolit, izolatör ve yarı-iletken yapıdaki biyosensörlerde de kullanılmaktadırlar (Menzel *et al.* 1998).

### 1.2.2.f. Amilaz enzimi ile etanol üretimi

Etanol yenilenebilir tarımsal bitkiler ve ürünlerinden üretilen bir biyolojik yakıttır. Nişasta molekülleri, etanol üretiminde kolay ulaşılabilir ve ucuz olmalarından ötürü sıklıkla substrat olarak tercih edilirler. *Saccharomyces cerevisiae* mayası fermentasyon ile şekerin etanole dönüşümünü sağlamaktadır (Mojsov 2012).

### 1.3. Nişasta

Nişasta, birçok glikoz molekülünün farklı şekillerde bağlanmasıyla oluşan bitkiler tarafından fotosentez yoluyla elde edilen polisakkarit yapısında suda çözünebilen bir bileşiktir (Tatar 2007). Bitkinin toplam ağırlığının %70'inden fazlasını nişasta oluşturmaktadır. Yüksek yapıli bitkilerde depo maddesidir. Nişasta, önemli bir homopolisakkarit, bol bir gıda rezervi ve enerji kaynağıdır (Sun *et al.* 2010). Nişasta amiloz ve amilopektin adı verilen iki tip glikoz polimerinden oluşan heterojen bir polisakkarittir.



**Şekil 1.2.** Nişastanın bileşenleri; a) Amiloz b) Amilopektin (El-Fallal *et al.* 2012).

Amiloz,  $\alpha$ -D-1,4 glikopironozil bağlarıyla birbirine bağlanan ve moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 300000 dalton olan lineer yapıda bir polimerdir. 100-700 arasında glukoz birimi taşır. Glukoz moleküllerinden oluşan zincir helezon şeklinde kıvrılarak her bir kıvrım 4-6 glukoz birimi içerecek hale gelir. Amiloz nişasta molekülünün iç bölgesinde yer alır ve nişastanın %15-20'sini meydana getirir. Amilopektin molekülü ise nişasta tanesinin dış bölgesindedir. Nişastanın %75-80'ini oluşturur (Balkan 2008). Amilopektin, dallanmış polimer yapıya sahiptir. Amilopektin molekülünün yan zincirleri, ana zincire  $\alpha$ -1,6 ve  $\alpha$ -1,4 bağlarıyla bağlı glikoz moleküllerinden oluşmaktadır (Tatar 2007). 500-2000 veya daha fazla glukoz ünitesine sahiptir. Her 24 ya da 30 glukoz ünitesinde bir dallanma oluşumu gözlenir (Baltaş 2012). Ana zincir ve yan zincirler amilozdaki gibi helezon şeklinde kıvrılmıştır (Balkan 2008). Amilopektin molekülü oda sıcaklığında bekletildiğinde kararlı bir eriyik oluşturur bu eriyik sıcak suda çözünmez (Baltaş 2012). Amiloz molekülü iyotla muamele sonrası mavi renk oluştururken, amilopektin molekülü menekşe renkli kompleks oluşturur. (Bamforth 2003; Bıçak and Ekmekçi 2005; Nugent 2005; Sajilata *et al.* 2006).

Yüksek termostabiliteye sahip mikrobiyal esaslı amilazlar genellikle ekstrem sıcaklıklarda yapılan şekerleştirme işlemlerinde kullanılmaktadır (Peixoto *et al.* 2003).

Karşılıklı bağların yapıları ve polimerizasyon derecesi, nişastanın farklı şekilde yapılanmasına neden olur. Nişasta moleküllerinin farklı jelatinleşme sıcaklığına sahip olması ve şişme gücü gibi özellikleri, nişastanın yiyecek endüstrisinde oldukça önemli olduğunu göstermiştir (Tatar 2007).

Nişasta granülleri için enzimatik hidroliz iki çeşittir; ilki nişasta granüllerinin yüzeyinden merkezine doğru olan sentripetal hidroliz, ikincisi ise nişasta granülünün dış yüzeyinde etki gösteren sentrifugal hidrolizdir (Sarıkaya *et al.* 2000). Nişasta molekülü su içerikli ortamlarda ısıya maruz bırakıldığında, nişasta granüllerini bir arada tutan hidrojen bağları zayıflar, nişasta şişer ve jelatin yapısını alır (Aiyer 2005). Nişasta endüstrisinde, glukoz ve maltoz şuruplarının eldesinde enzimler kullanılmaktadır. Nişasta moleküllerinden şeker eldesi olan sakkarifikasyon basamağında %15 nişasta

içeren bulamaç yapı 105°C'ye kadar ısıtılarak jelatinize hale getirilir. Jelatinizasyon işlemi sayesinde, amilazın nişastaya etki edebilmesi adına kristal yapı açılmış olur. Jelatinizasyon prosesi bulamaç yapının vizkozitesini artırır, bu da hem karıştırma hem de pompalamada problemlere neden olur. Bu problemi önlemek için jelatinize nişasta eş zamanlı şekilde yüksek sıcaklıkta  $\alpha$ -amilaz enzimi ile sıvı hale getirilir. Daha sonra 50°C-60°C gibi daha düşük bir sıcaklıkta glikoamilaz enzimi ile şekerleştirme olayı gerçekleştirilir (Goyal *et al.* 2005).

Ticari nişastanın temel kaynağını mısır oluşturmaktadır. Bununla yanı sıra patates, buğday ve diğer hububat çeşitleri ticari nişasta eldesinde kullanılmaktadır. Dünyada üretilen mısırın yıllık %5'i mısır nişastasını üretiminde kullanılır. Elde edilen mısır nişastasının %70'i mısır şurubu, yüksek fruktozlu mısır şurubu ve dekstroza dönüştürülür. Pirinç nişastasını en küçük granüle sahip olan ticari nişasta çeşididir. Kozmetikte pudra tozu olarak, pudding ve dondurmada ise yoğunlaştırıcı olarak kullanılmaktadır. Patates nişastasını ise yiyecek, kağıt, tekstil ve yapıştırıcı sanayinde tercih edilir.  $\alpha$ -amilazlara dirençli nişastanın da bulunduğu bilinmektedir (Öztürk 2013).

#### 1.4. Termofilik mikroorganizmalar

Bakteriler yaşayabildikleri sıcaklık aralığına göre psikrofiller, mezofiller ve termofiller olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Psikrofiller -10°C'ye kadar olan sıcaklıklarda yaşayabilirler ancak optimum olarak büyüebildikleri sıcaklık genellikle 15°C'dir. Mezofiller oda sıcaklığında (20-45°C) büyüebilirler ve insanlar için patojen olan mikroorganizmalar bu grupta yer almaktadır. Termofiller ise 45°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve hatta kaynar sularda bile yaşayabilmektedir (Baltaş 2012). Dünya üzerinde yaşayan bütün bakterilerin atalarının termofilik bakteriler olduğu öne sürülmektedir (Madigan *et al.* 2000). Termofilik bakteriler doğada genel olarak kaplıcalarda, tropik topraklarda, gübre yığınlarında, gübreyi oluşturan dışkılarda, çöplerde vb. yerlerde bulunmaktadır (Baltaş 2012).

Termofilik organizmalar termotolerant, hipertermofil ve ekstrem termofil olarak üç

gruba ayrılırlar. 60°C-115°C'de yaşayan organizmalar termofil, 80°C ve üzeri sıcaklıklarda üreyebilenler ekstrem temofil, 60°C-80°C'dekiler hipertermofil, 50°C-60°C'de gelişim gösterenler ise termotolerant olarak isimlendirilir (Burhan *et al.* 2003). Termofilik ve hipertermofilik enzimler karakteristik olarak 40°C'nin altındaki sıcaklıklarda etkin şekilde aktivite göstermezler (Gomes and Steiner 2004).

Üzerinde en çok çalışma yapılan termofilik bakteri türü *Bacillus steorothermophilus*'dur. Bu türe ait çok sayıda farklı suş izole edilmiş ve bu suşların birçok özelliği belirlenmiştir. Ancak elde edilen bu bakterilerin hepsi genellikle optimum olarak 60°C'de yaşamaktadır. Bununla birlikte çalışılan çok az sayıda termofilik bakteri türünün 75°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabildiği bilinmektedir (Baltaş 2012).

Termofilik organizmalarda hücre membranı doymuş yağ asitlerinden meydana gelmiştir. Doymuş yağ asitleri hücre için hidrofobik bir ortam sağlar ve bu durum yüksek sıcaklıklarda hücrenin yaşama şansını artırır (Tatar 2007). Hidrofobik etkileşimler termofilik proteinlerin kararlılığında önemli bir yere sahiptir. Hidrofobik ortamda, sıcaklığa karşı dirençli olan proteinler dimerler oluşturup termal parçalanmaya karşı daha stabil bir yapıya bürünürler. Ayrıca sıcaklığa karşı dirençli proteinler disülfid bağları, molekül içi aromatik yapıları, zengin hidrojen bağlarını içerirler ve elektrostatik mekanizmalarla yüksek sıcaklığı tolere ederler (Kumar and Nussinov 2001). Şaperon adındaki bu özel proteinler, termofilik organizmalar tarafından bolca üretilir ve bunlar denatürasyondan sonra proteinlerin tekrar doğal formlarında katlanmasına ve fonksiyonlarını tekrar kazanmalarına yardımcı olurlar (Everly and Alberto 2000).

#### 1.4.1. *Bacillus* cinsi

*Bacillaceae* familyasının bir üyesi olan bu cinsin hücreleri çomak, düz veya düze yakındır. Bir çok olumsuz ortam koşulları için oldukça dirençli endosporlara sahiptirler. Ayrıca gram pozitif, peritrik kamçılı, aerobik yada fakültatif anaerobturlar. Hücrede yer alan sporun şekli ve hücredeki konumu, türler arasında farklılık göstermektedir. Bu

cinsin sporları genellikle silindirik, elipsoidal, oval ya da yuvarlak şekildedir. Sporun hücre üzerindeki konumu merkezde, merkeze yakın veya uçta olabilmektedir. *Bacillus* cinsinin pek çok türünde hücre duvarı çapraz bağlarla bağlanmış mezo-diamino pimelik asitten oluşmuştur (Tatar 2007). Çoğunlukla mezofiliktirler. Bunun yanı sıra psikrofilik ve termofilik türleri de mevcuttur (Ayhan 2000). Karbohidrataz enzimlerinin en önemli kaynağını *Bacillus* cinsindeki organizmalar oluşturmaktadır. *Bacillus* türleri toprakta, suda ve çeşitli gıdalarda bulunabilmektedir (Tatar 2007).

Endüstriyel süreçlerde yaygın olarak kullanılan bir cinstir. Kolay üreyebilmeleri, bulundukları kültür ortamına enzim salgılamaları, özellikle insanlar ve hayvanlar için çok fazla patojenik formunun bulunmaması *Bacillus* cinsinin üyelerini endüstriyel alanda önemli kılmıştır (Öztürk 2013). *Bacillus* cinsi içerisinde yer alan mikroorganizmalardan (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. caldolyticus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus*, *B. amylosacchariticus* vb.) farklı bilim insanları tarafından değişik zaman dilimlerinde  $\alpha$ -amilaz enziminin varlığı saptanmış ve karakterize edilmiştir (Tatar 2007). Endüstride sıkça amilaz üreticileri olarak; *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* bakterileri kullanılmasına rağmen (Souza *et al.* 2010), son yıllarda yüksek sıcaklıklardaki kararlılıkları nedeniyle *B. stearothermophilus* ve *B. licheniformis* türlerine ait suşlardan elde edilen  $\alpha$ -amilaz enzimi biyoteknolojik proseslerde tercih edilmektedir (Bertoldo and Antranikian 2002). Birçok *Bacillus* türü, hem amilaz üretimini ve hem de nişasta hidrolizini gerçekleştirse de, *B. azotoformans*, *B. badius*, *B. fastidiosus*, *B. insolitus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. lentimorbus*, *B. marinus*, *B. pateurii*, *B. popilliae*, *B. pumilus*, *B. schlegelli* ve *B. sphaericus* türleri ise nişasta hidrolizini gerçekleştirememektedir (Gupta *et al.* 2003).

Nişasta moleküllerinin yüksek sıcaklıklarda jelatinleştirilmesi (100-110°C) ve sıvılaştırma (80-90°C) prosesleri için termofilik ve termostabil  $\alpha$ -amilaz enzimleri oldukça önemlidir (Tatar 2007).

#### 1.4.1.a. *Bacillus licheniformis*

*B. licheniformis*, tüm dünyada topraklardan ve bitki materyalinden izole edilebilen gram pozitif endospor oluşturan bir organizmadır. Bu organizma, 20-25 g/L'e kadar büyük miktarlarda protein salgılar ve ekzoenzimlerin büyük ölçekli endüstriyel üretiminde de yaygın olarak kullanılır (Divakaran *et al.* 2011). Özellikle, *B. licheniformis*'in yüksek protein salgılama kapasitesi onu ticari olarak kullanılan enzimlerin (örneğin amilazlar, fitazlar, proteazlar) büyük ölçekli üretimi için cazip bir konak haline getirmiştir. Patojenitesi olmayan bu türün bazı suşları probiyotik olarak kabul edilir, gıda ve yem endüstrisinde de kullanılır.

### 1.5. Mikroorganizmalar İçin Moleküler Tanımlama Yöntemleri

#### 1.5.1. 16S rRNA dizi analizi

Dizi analizi için kullanılacak olan hedef genlerin belirli özelliklere sahip olması gerekir. Bu özellikler:

- ✓ Hedef genin fonksiyonu evrim süresince değişmemiş olmalıdır.
- ✓ Hedef gen bakterilerin tamamı için korunmuş olan bölgeyi içermelidir.
- ✓ Hedef genin içerdiği korunmuş bölgeyi çevreleyen değişken bölgeler de bulunmalıdır.

Daha önce yapılan çalışmalarda; genetik olarak korunmuş bölgelerin, bakteri sistematğinde kıyaslanması ile bakterilerin filogenetik akrabalıklarının ortaya konulabileceği gösterilmiştir (Kolbert and Persing 1999).

Bu amaçla incelenen korunmuş bölgelerin; 5S, 16S ve 23S rRNA'yı şifreleyen genlerden oluştuğu belirlenmiştir. Bu genetik lokasyonlar içerisinde bakteri sistematığı için en önemli bölge 16S rRNA'dır (Garrity and Holt 2001). Sistematikte 16S rRNA

gen bölgesi yalnızca bakteriler ile değil, aynı zamanda arkelerin 16S rRNA ve ökaryotların 18S rRNA gen bölgeleri ile de karşılaştırılabilir (Tortoli 2003).

16S rRNA'nın bakteri sistematğinde bu denli önemli olmasının nedenleri; 16S rRNA gen bölgesi tüm bakterilerde bulunur, fonksiyonel olarak korunmuş bir bölgedir, gen analizi için uygun büyüklüğe (~1550 bp) sahiptir, tüm bakterilerde korunmuş ve heterojen bölgelere sahiptir ve yeterli veritabanına sahip olması olarak ifade edilebilir (Harmsen and Karch 2004).

Ayrıca 16S rRNA gen bölgesi korunmuş bölge olduğu için hücresel fonksiyonlar açısından oldukça önemlidir. Bu bölgede meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon da kolaylıkla tolere edilebilir. 16S rRNA geni bölgesindeki değişim tam olarak açıklanamasa da organizmalar arasındaki benzerlik ve farklılıklar net bir şekilde ortaya konmaktadır (Harmsen and Karch 2004).

16S rRNA gen bölgesi antimikrobiyal kimyasallara karşı duyarlıdır. Bu yüzden gende oluşabilecek herhangi bir mutasyon fark edilebilir. Meydana gelebilecek mutasyon organizmanın antimikrobiyel kimyasallara karşı duyarlılığını etkiler ve fenotipik bir direnç meydana gelir. Bu da 16S rRNA gen dizilimi ile ortaya çıkar. Gen bölgesinin bu özelliği özellikle klinik mikrobiyolojide oldukça önemli bir yere sahiptir ve bakteriyel sistematik açısından da herhangi bir sorun teşkil etmemektedir (Pfister *et al.* 2003a; Pfister *et al.* 2003b). Ayrıca 16S rRNA gen bölgesinin bu özelliği genetik olarak daha uzak mesafeli ilişkilerin aydınlatılmasında oldukça önemlidir (Garrity and Holt 2001).

16S rRNA gen bölgesi; bakterilerde ortak olarak bulunan, korunmuş, farklı heterojen bölgeler içeren ve bundan ötürü de bakteriler arasında ki filogenetik ilişkinin belirlenmesi açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Ayrıca 16S rRNA gen analiz yöntemi; yeni cins ve türdeki bakterilerin tanımlanması, gelişimi zor olan mikroorganizmaların tanısı, klinik öneme sahip patojenlerin belirlenmesi ve antibiyotik tedavisi sürecinde etken belirlenmesi açısından da oldukça önemlidir (Çetinkaya 2011).

### 1.5.2. Genomik parmak izi analizi

Genomda sayısı ve yeri türe göre değişebilen çok sayıda tekrar dizisi bulunmaktadır. Bu durum bakteri DNA'sı için de geçerlidir. Bakteri DNA'sı içerisinde sürekli tekrar eden diziler korunmuş bir yapıya sahiptir. Korunmuş olan bölgeler bakteri sistematigi açısından da oldukça önemli bir yer teşkil etmektedir (Arslan 2017).

Bakteri sistematigi içerisinde korunan dizilere yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda; genom içerisinde bulunan terkar dizileri PCR ile amplifiye edilmiştir. Elde edilen spesifik bantlar birbirleri ile kıyaslaması yapılarak sistematik bilimi içerisinde tiplendirme amacıyla kullanılmıştır (Versalovic *et al.* 1994).

REP, ERIC, BOX ve (GTG)<sub>5</sub> bölgeleri genom içerisinde bilinen tekrarlı dizilerdir. Bu bölgelerin sistematik açısından kullanımı PCR ile amplifikasyonundan geçmektedir. Tekrarlayan dizilere spesifik olan PCR yöntemleri; REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR olarak adlandırılmış olup, bu yöntemlerin hepsine birden rep-PCR adı verilmektedir. Bu PCR yöntemi; bakteri genomu içerisinde korunmuş ve tekrarlayan DNA dizilerinin amplifikasyonu ile karakterize edilmiş olan bir genomik parmak izi analiz yöntemidir (Lupski and Weinstock 1992).

Genomda tekrar edilen diziler göz önünde bulundurulduğunda bu dizilerin temelde üç farklı türünün tanımlandığı görülmüştür. Bunlar:

- REP dizileri: Yaklaşık 35-40 baz çifti büyüklüğündeki elementlerden oluşan dizilerdir.
- ERIC dizileri: Bu diziler yaklaşık 124-127 baz çifti büyüklüğünde korunmuş olan palindromik dizilerdir.
- BOX dizileri: Yaklaşık olarak 154 baz çiftlik dizilerdir. BOX dizileri; BOXA, BOXB ve BOXC olmak üzere üç adet korunmuş alt üniteye sahiptir.

### 1.5.3. Filogenetik analiz

Filogeni bakteri sistematikinde, mikroorganizmalar arasındaki evrimsel bağlantıyı açıklayan bir bilim dalıdır. Filogenetik analizlerde DNA ve protein dizileri temel alınmaktadır. Bu dizilere ait benzerlik ve farklılıklar organizmalar arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Bu bilgilerin daha net bir şekilde anlaşılabilmesi için elde edilen bilgiler ışığında filogenetik ağaçlar çizilir ve yorumlanır. Genel olarak filogenetik bilimi üçe ayırılır (Arslan 2017):

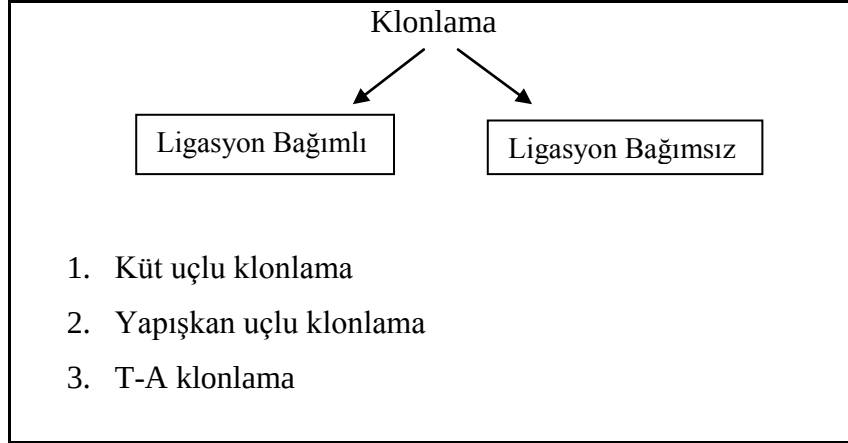
**Bilgisayar destekli filogenetik:** Bilgisayar algoritmaları, metotları ve programları filogenetik analizlere uygulanır.

**Geleneksel filogenetik:** Organizmaların fenotipik özellikleri ölçülür ve miktarları belirlenerek morfolojik bilgilere dayandırılır.

**Moleküler filogenetik:** Organizmanın genlerini kodlayan nükleotid dizileri ya da proteinlerini kodlayan aminoasit dizileri sınıflandırılır.

### 1.5.4. Klonlama

PCR türevli DNA fragmentlerinin başarılı şekilde klonlanması, çoğaltılan DNA'ların daha sonraki analizleri için oldukça önemlidir. Birçok klonlama yönteminin yanı sıra ticari klonlama kitleri de bulunmaktadır. Genel anlamda klonlama ligasyon bağımlı klonlama ve ligasyon bağımsız olarak iki gruba ayrılmakta olup, daha çok ligasyon bağımlı klonlama tercih edilmektedir (Guo and Bi 2002).



Uygun yöntemin seçiminde en önemli faktör klonlamanın amacıdır. Seçilen klonlar protein ekspresyonunda kullanılacaksa ekspresyon vektöründe yönlü klonlama istenebilir. Diğer bir faktör, PCR ürünleri ile örtüşen uygun vektörün seçilmesi ve hazırlanmasıdır. Üçüncüsü ise, genelde kullanılan plazmit vektörlerin klonlama kapasitesinin dışında kalan çok uzun PCR ürünlerinin (10 kb'den fazla) klonlanmasında, kozmit ya da DNA vektörlerinin kullanımıdır. “Insert” içeren klonların seçimini kolaylaştırmak ve klonlama etkinliğini geliştirmek için pozitif klonların etkin bir tarama sistemi ile taranması da oldukça önemlidir (Guo and Bi 2002; Kahn and House 2004).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Wang *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada nişasta moleküllerinin konformasyonuna bağlı olarak  $\alpha$ -amilaz enziminin substrat üzerindeki etkinliğinin farklı olduğunu belirtmişlerdir. Bunun için beş farklı nişasta molekülünde  $\alpha$ -amilaz enziminin etkinliği araştırılmış ve nişastanın çözünürlük yüzdesiyle enzim etkinliğinin arttığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada, WangLB bakteri suşunun amilaz enzimini ürettiği tespit edilmiş ve 16S rRNA analizine dayanarak bu şusun *Bacillus* cinsinin bir üyesi olduğu tespit edilmiştir.  $\alpha$ -amilaz enziminin afinite kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırıldığı bildirilmiştir. Ayrıca amilazın molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 55 kDa olarak belirlenmiştir. WangLB için optimum sıcaklık 35°C, pH 10,0 olarak tespit edilmiştir. Enzimin geniş bir sıcaklık aralığında (50-85°C) ve pH değerlerinde (3,0-10,0) yüksek etkinlik gösterdiği bildirilmiş ve amilaz aktivitesinin kalsiyum ( $\text{Ca}^{2+}$ ) bağımsız olduğu belirlenmiştir. Kinetik parametreler  $K_m$  ve  $V_{max}$  sırasıyla  $0,37 \pm 0,02$  mg/mL ve 233 U/mg olarak rapor edilmiştir. Son olarak, beş farklı nişasta markası hidroliz olayı için denenmiş ve amilaz enziminin her biri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Amilaz enzimi ile substratın hidroliz edilebilirliğinin, nişasta çözünürlüğü ile birlikte arttığı bulunmuştur.

Nwokoro *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* CB-18'den alkaline  $\alpha$ -amilazın biyokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmişler ve bu enzimin çeşitli nişastalar üzerindeki substrat spesifitelerini değerlendirmişlerdir. *B. subtilis* CB-18  $\alpha$ -amilaz enzimi amonyum sülfat çöktürme, soğuk aseton uygulamaları ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Amilaz enzimi optimum pH 8,0'de, 34,3 U/mg protein elde edilmiştir. Stabil pH aralığı 8,0-9,0 olarak bulunmuştur. En yüksek aktivite 50°C sıcaklıkta gözlenmiş enzimin termo stabilitesi ise 40-50°C olarak belirlenmiştir.  $\alpha$ -amilaz enziminin, sırasıyla manyok bitkisi, patates, mısır, pirinç ve çözümlü nişasta moleküllerini hidrolizi sonucunda 5,86, 4,75, 3,44, 3,96, 8,84 mg/mL serbest glukoz oluşumuna neden olduğu rapor edilmiştir.

Kalpana and Pandian (2014) tarafından çözünmeyen ham nişastaları sindirme kabiliyetine sahip bir halotolerant  $\alpha$ -amilaz enzimi *Bacillus subtilis* S8-18'den izole edilmiş ve karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonucunda *B. subtilis*  $\alpha$ -amilazının 57 kDa'lık molekül ağırlığına sahip bir monomer olduğu belirlenmiştir. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 60°C ve 6,0 olarak bulunmuştur. Enzim %84-94 etkinlik göstererek 4,0-12,0 arasında geniş bir pH aralığında 24 saat boyunca oldukça kararlı kalabilmiştir. İlginç bir şekilde, 24 saat sonra bile %72'lik bir aktiviteyi muhafaza ettiği bildirilmiştir. Enzimin ayrıca %28 NaCl'ye karşı tolerans gösterdiği belirtilmiştir.  $\alpha$ -amilazın, seçilen iki değerlikli metal iyonları için 1 mM konsantrasyonda en az %93 oranında aktivitesini muhafaza ettiği belirtilmiştir. Enzimin, 1 mM EDTA'dan etkilenmeden kaldığı ve 5 mM konsantrasyonda bile %96 aktivite sergilediği bu yüzden de oldukça stabil bir yapıda olduğu belirtilmiştir. %1 SDS amilaz aktivitesinde kayda değer bir düşüşe (%68) yol açmış olsa da, enzim %85 etkinlikle diğer deterjanlara (Triton-X ve Tween 80'in %1'i) karşı tolerans gösterdiği rapor edilmiştir.

Abdel-Fattah *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmada toprak ve su örneklerinden 200 bakteri izole edilmiş ve bu bakterilerin moleküler tanımlama, karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kültür süpernatantı diyaliz işlemi ile konsantre hale getirildikten sonra anyon değişim kromatografisi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre AI20  $\alpha$ -amilaz enziminin 59,34 kat %12,62 verimle saflaştırıldığı bildirilmiştir. *B. licheniformis* AI20  $\alpha$ -amilaz enziminin moleküler ağırlığı 55 kDa olarak optimum sıcaklık ve pH'sı ise sırasıyla 60-80°C ve 6-7,5 olarak belirlenmiştir. AI20  $\alpha$ -amilaz enzimi için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri 0,709 mg/mL, 454 mU/mg olarak tespit edilmiştir. *B. licheniformis* AI20 tarafından üretilen  $\alpha$ -amilazı %10 oranında etanol, metanol, isopropanol, aseton gibi çözücüler ile gliserol gibi kimyasallara karşı büyük bir kararlılık gösterdiği, %20 konsantrasyonda ise bazı çözücülerin (etanol, metanol, isopropanol) enzim aktivitesinde az da olsa düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Aseton ve gliserolün ise enzim aktivitesini etkilemediği saptanmıştır. AI20  $\alpha$ -amilazın  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  iyonlarının 0,1mM konsantrasyonda enzim aktivitesini etkilemediği, 1mM konsantrasyonda ise  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonlarının %8-9 oranında bir kayba

neden olduğu, 10 mM konsantrasyonda  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$ 'nın sırasıyla %75 ve 45 oranında aktivitede kayba neden olduğu belirlenmiştir.  $\text{Hg}^{2+}$ 'nın 1 ve 10 mM konsantrasyonlarda enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiği bulunmuştur. Enzimin %0,25 konsantrasyonda EDTA ve EGTA tarafından sırasıyla %45 ve 35 oranında inhibe edildiği gözlenmiştir.

Divakaran *et al.* (2011) yaptıkları çalışmada *B. licheniformis*, MTCC 2617 ve 2618 suşlarından  $\alpha$ -amilaz üretimini karşılaştırmışlardır. En yüksek üretimin 72. saatte görüldüğü ve ham enzimin karakterize edildiği optimum aktivitenin pH 7,0 ve 37°C sıcaklıkta olduğu gözlenmiştir. Saf enzim elde etmek için amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve iyon değişim kromatografisi sırasıyla uygulanmıştır.

Vengadaramana *et al.* (2011) tarafından yapılan çalışmada *B. licheniformis* ATCC 6346 tarafından üretilen ham ve saflaştırılmış  $\alpha$ -amilazın substrat özgüllüğüne bakılmış, ham enzimin amiloz, amilopektin, pektin, kitin, ksilan ve maltoza karşı sırasıyla %119,3, 77,7, 25,5, 27,4, 5,7 ve 20,3 aktivite gösterdiği, çözünür nişasta ile karşılaştırıldığında ise selüloz, pullulan ve sukroza karşı aktivite göstermediği bulunmuştur. Saflaştırılan amilazın ise amiloz, amilopektin, pektin, kitin, ksilan ve maltoza karşı sırasıyla %107,42, 60,02, 19,64, 21,17, 0 ve 20,3 aktivite gösterdiği görülmüştür. Amilazın selülozu hidroliz etmemesinin yapısında bulunan  $\beta$ -1,4 bağlarından kaynaklandığı belirtilmiştir. Enzimin nişasta, amilopektin ve amiloza karşı hidroliz edebilme yeteneğinin olduğu bildirilmiştir.

Hmidet *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada *B. licheniformis* NH1  $\alpha$ -amilazının optimum sıcaklığının 90°C olduğu, 80°C ve 100°C de ise aktivitesinin %79 ve 92'sini koruduğu saptanmıştır. Amilazın 1 saat boyunca 70°C stabil olduğu, 85 ve 90°C'de 30 dakikalık inkübasyon sonunda aktivitesinin tamamını koruduğu gözlenmiştir. 90°C de ortama 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ilave edildiğinde enzimin yarı ömrünün 15 dakika olduğu, kalsiyum yokluğunda ise 3 dakika olduğu saptanmıştır. Kalsiyum iyonu varlığında termal inaktivasyona karşı amilaz termostabilitesinin geliştiği ve bunun da enzimin A ve B domain köprüleri arasındaki ana kalsiyum bağlanma bölgesindeki Ca-Na-Ca metal üçlüsü ile etkileşime girmesi sonucunda gerçekleştiğini belirtmişlerdir. *B. licheniformis*

NH1  $\alpha$ -amilazının aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonları için 2 mM konsantrasyonda etkisine bakılmış ve  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  iyonlarının enzim aktivitesini etkilemediği saptanmıştır.  $\text{Mg}^{2+}$  iyonunun enzim aktivitesini çok az etkilediği (%7),  $\text{Hg}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$ 'nin enzimi tamamen inhibe ettiği gözlenmiştir. Şelat ajanı olarak bilinen EDTA'nın ise enzim aktivitesini inhibe ettiği ve bunun sonucu olarak *B. licheniformis* NH1  $\alpha$ -amilazının metale bağımlı bir enzim olduğu saptanmıştır.

Azad *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada kozalak çekirdekleri tohumundan izole edilen  $\alpha$ -amilaz enzimi; amonyum sülfatla çöktürme, DEAE anyon değişim kromatografisi ve nişasta afinite kromatografisi kullanılarak 1286,1 kat %5,8 verimle saflaştırıldığı rapor edilmiştir. Saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz izoenziminin SDS-PAGE'de 44 ve 45 kDa olarak iki bant şeklinde görüldüğü bildirilmiştir.  $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum sıcaklık 65°C ve optimum pH ise 4,5 olarak bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin 50°C'de 48 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin tamamını koruduğu, 96 saat inkübe edildiğinde ise aktivitesinin %80 oranında korunduğu bildirilmiştir. Enzimin  $K_m$  değeri 0,84 mg/mL ve  $V_{max}$  değeri ise 3,71  $\mu\text{mol}$  glukoz/dak olarak bulunmuştur.

Hmidet *et al.* (2008) *B. licheniformis* suşunda  $\alpha$ -amilaz enzimini eksprese eden amyN geni *Escherichia coli* bakterisine klonlamışlardır. Klonlanan enzim jel filtrasyon ve anyon değişim, kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı 58 kDa olarak bulunmuştur. *B. licheniformis* NH1  $\alpha$ -amilazının 1 saat 40°C de %1 oranında Tween-20 ve Triton X-100 ile muamele edildiği ve bu süre sonunda aktivitede herhangi bir kayıp olmadığı bildirilmiştir. %10'luk SDS varlığında ise aktivitede %20 oranında bir azalma olduğu, %1'lik sodyum perborat (okside edici ajan) varlığında ise 1 saat sonunda %43 oranında kayıp olduğu bildirilmiştir (Hmidet *et al.* 2008).

Saxena *et al.* (2007), *Bacillus* sp. PN5 suşu topraktan izole edilmiş amonyum sülfat ile kısmi saflaştırma işlemi yapılmış ve 65,23 U/mL amilaz aktivitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Saflaştırılan amilaz enziminin, maksimum aktivitesini pH 10,0, 90°C'de gösterdiğini ve enzimin 80-100°C arasında %100 stabil davranış gösterdiğini gözlemlemişlerdir. PN5 amilaz enzimi pH 10,0'da 1 saatlik inkübasyon sonunda

aktivitesinin %80'ini muhafaza ettiği bildirilmiştir. Ayrıca SDS ile 1 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesi %86,36 olarak belirlenmiştir. *Bacillus* sp. PN5 amilaz enzimi 105°C'ye kadar yüksek sıcaklığa dayanıklı ve yüksek alkali özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PN5 amilaz enziminin deterjan sanayinde, endüstriyel alanda nişastanın sıvılaştırılmasında kullanılmaya aday olduğu rapor edilmiştir.

Naqurajan *et al.* (2006) tarafından yapılan araştırmada *B. subtilis* KCC103'den elde edilen  $\alpha$ -amilazın hidroliz sonucunda bir maltooligosakkarit oluşturduğu görülmüştür.  $\alpha$ -amilaz, aseton çöktürme ile kısmi saflaştırma yapıldıktan sonra anyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin 53 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Enzimin 5,0-7,0 arasında geniş bir pH aralığında oldukça aktif ve pH 4,0-9,0 arasında stabil olduğu belirlenmiştir. Optimum sıcaklık 65-70°C olmasına rağmen enzim 70°C'de hızla aktivitesini kaybetmiş ve yarı ömrünün 7 dk olduğu görülmüştür. 50°C'de ise yarılanma ömrü 94 dk olarak bildirilmiştir.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 2,6 mg/mL<sup>-1</sup> ve 909 U mg olarak rapor edilmiştir. Ca<sup>2+</sup> iyonunun enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, EDTA molekülünün 50 mM konsantrasyonda enzim aktivitesinin %50'sini ortadan kaldırdığı belirtilmiştir. Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>2+</sup> iyonlarının enzim aktivitesini kuvvetli bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir.  $\alpha$ -amilaz enziminin, endolitik aktivite gösterdiği, küçük maltooligosakkaritler (2kDa-4kDa) ve daha büyük (5kDa-7kDa) maltooligosakkaritler meydana getirdiği tespit edilmiştir.

Lee *et al.* (2006) *B. amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amilazı ile yaptıkları çalışmada yabani tip enzim (WT) ve varyant enzimlerin (M77, M111 ve 21B), nişasta hidroliz aktivitesi ve termal stabilitesini karşılaştırmışlardır. Hepsinin 6,0 civarında optimum bir pH'ya ve aynı  $K_m$  ve  $K_{cat}$  değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ca<sup>2+</sup> iyonu yokluğunda optimum sıcaklık, WT ve M77 için 60°C ve M111 ve 21B için 40°C olarak belirlenmiştir. M111 ve 21B'nin 5 mM CaCl<sub>2</sub> ilavesi ile optimum aktivitelerinin 50-60°C'ye yükseldiği, WT ve M77 suşları üzerinde değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Ca<sup>2+</sup> ilavesi ile WT ve M77 için  $K_d$  ayrışma sabitlerinin M111 ve 21B'den daha düşük

olduğu bildirilmiştir. WT'deki Asp233 bölgesi, M111 ve 21B'de Asn ile değiştirilirken, M77'de sabit tutulduğu için, Asp233 bölgesinin enzimin  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu bağlanması yoluyla enzimde termal stabiliteye etki ettiği gözlenmiştir.

Kaneko *et al.* (2005) yapmış oldukları çalışmada çamurdan izole edilen bakteri suşunun 16S rRNA analizi sonucunda *Streptomyces* sp. cinsine ait olduğu belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. elde edilen amilaz enzimi amilazın nişastaya tutunması yöntemi ile 32,7 kez %88 verimle saflaştırılmış molekül ağırlığı 47 kDa olarak tespit edilmiştir. Optimum pH 6,0 optimum sıcaklık 50-60°C olarak belirtilmiştir. Enzim  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ve  $\text{Mg}^{2+}$  iyonları tarafından aktive edilmiş  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  iyonları tarafından inhibe edilmiştir. Enzimin spesifik aktivitesi 11,7 U/mg olarak rapor edilmiştir.

Najafi ve Kembhavi (2005) tarafından yapılan çalışmada *Vibrio* sp.  $\alpha$ -amilaz enziminin nişastaya tutunma yöntemi ile 163,5 kat %78 verimle saflaştırıldığı rapor edilmiştir. *Vibrio* sp. elde edilen enzimin molekül ağırlığı 52,48 kDa, optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 55-60°C ve 6,5 olarak bulunmuştur. Enzimin 30 dk'lık inkübasyon sonunda 65°C'de aktivitesini %85 oranında koruduğu belirtilmiştir. EDTA ve EGTA ile muamele sonucu enzimin inhibe olduğu,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının ise enzim aktivitesini %25-%55 aralığında etkilediği belirlenmiştir. *Vibrio* sp. amilaz enzimin aktivitesinin metal bağımlı olduğu bildirilmiştir.

Mendu *et al.* (2005) tarafından yapılan çalışmada *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilazının saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi, nişasta afinite metodu kullanılmış ve saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 58 kDa olarak bulunmuştur. Nişasta afinite kromatografisinde enzimler %2'lik dekstrin ile elüe edilmiş 230 kat, %51 verimle saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat ile çöktürmenin kısmi bir saflaştırma yöntemi olmakla beraber çeşitli mikrobiyal türler üzerinde uygulandığı ayrıca afinite kromatografisinin enzimlerin saflaştırılmasında iyi bir seçenek olduğu rapor edilmiştir.

Rao *et al.* (2005) Termofilik *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilazını, %20-80 amonyum sülfatla çöktürme yaptıktan sonra nişasta afinite kolonu ile 230 kat %51 verimle

saflaştırmışlardır. Kolona tutunan enzim maltoz, çözünür nişasta ve tuz çözeltisiyle elüe edilememiş fakat %2'lik dextrin çözeltisi ile elüe edilmiştir. SDS-PAGE yapılarak saf enzimin molekül ağırlığı 58 kDa olarak belirlenmiştir. Western blot analizi ile  $\alpha$ -amilaza karşı oluşan antikor sayesinde saflaştırılan enzimin  $\alpha$ -amilaz enzimi olduğu doğrulanmıştır.

Abou-Zeid (1997) tarafından yapılan çalışmada *Aspergillus flavus* amilaz enzimi nişasta afinite, aseton çöktürmesi yöntemleri ile 262,32 kat %0,57 verimle saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı 75 kDa olarak tespit edilmiştir.

Prieto *et al.* (1995) yapmış oldukları çalışmada *Lipomyces kononenkoae* CBS 5608 suşudan izole edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, nişasta afinite metodu, DEAE Bio-Gel yöntemi ile 6000 kat %52 verimle saflaştırdıkları rapor edilmiştir. SDS-PAGE analizi sonucunda enzimin 76 kDa bir molekül ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir. CBS 5608  $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum pH 4,5-5,0 optimum sıcaklık 70°C olarak tespit edilmiştir. Kinetik analizler sonucu enzimin bir endoamilolitik mekanizmaya sahip olduğunu ve  $K_m$  değerinin 0.80 g.L<sup>-1</sup> ve  $K_{cat}$  değerinin 622 s<sup>-1</sup> olduğu rapor edilmiştir.

## 2.1. Tezin Amacı

Termofilik mikroorganizmalar ve bunlardan elde edilen enzimler endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda oldukça önemli olup, bu organizma grubundan elde edilen amilazlar; gıda, tekstil, deterjan, kağıt başta olmak üzere pek çok alanda yaygın uygulama alanına sahiptir.

Bu tez kapsamında; Nevşehir-Kozaklı kaplıcasından alınan su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu, *B. licheniformis* SO7 bakteriyel  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece endüstriyel alanda sıcaklık kararlılığı yüksek olan enzimlere duyulan ihtiyaç doğrultusunda termofilik mikroorganizmaların izolasyonu ve bu mikroorganizmalardan

elde edilen enzimlerin biyoteknolojik açıdan uygulanabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar

**Çizelge 3.1.** Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazlar

| Materyal ve Cihazlar              | Şirket                             |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| 3 mL'lik kuvarz küvetler          | Merck                              |
| 1,5-2 mL'lik tüpler ve raklar     | Eppendorf                          |
| 15 mL'lik falkon tüpler ve raklar | Eppendorf                          |
| Derin Dondurucu (-86°C)           | New Brunswick Premium U410         |
| Derin Dondurucular (-20°C)        | Siemens, Arçelik                   |
| Destile Su Üretme Cihazı          | mp MINIpure DEST up                |
| Elektroforez Cihazı               | Sigma Aldrich                      |
| Güç Kaynağı                       | Thermo EC EC 135-90                |
| Hassas Terazı                     | OHAUS PIONEER                      |
| Isı Bloğu                         | Lab Line                           |
| Kar Üretme Cihazı                 | Scotsman                           |
| Magnetik Karıştırıcı              | Heidolph MR Hei-standart           |
| Mikrodalga Fırın                  | Beko MD 1500                       |
| Mikropipet Seti                   | Eppendorf                          |
| Mini Santrifüj                    | AOSHENG                            |
| Nanodrop                          | Thermo Scientific Multiscan GO USA |
| Otoklav Cihazı                    | HMC HIRAYAMA                       |
| PCR                               | BIO RAD C1000 Thermal Cyclers      |
| pH Metre                          | METTLER TOLEDO                     |
| Santrifüj Cihazı                  | Hettich Mikro 220R Zentrifugen     |
| Steril Kabin                      | TELSTAR BIO-II-A                   |
| İnkübatör                         | Thermo SCIENTIFIC HERATHERM        |
| Çalkalamalı İnkübatör             | ZHICHENE                           |
| Etüv                              | BINDER                             |
| UV-VIS Spektrofotometre           | Beckman Coulter                    |
| Vorteks                           | Wisd WiseMix VM-10                 |

### 3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

**Çizelge 3.2.** Kullanılan kimyasallar

|                                                                                  |            |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Agaroz                                                                           | Sigma      |
| Agaroz DNase-RNase-Protease free                                                 | Sigma      |
| Amfisilin                                                                        | Sigma      |
| DTNB                                                                             | Sigma      |
| Dinitrosalisilikasit (DNS)                                                       | Sigma      |
| Dimetilsülfoksit (DMSO)                                                          | Sigma      |
| Distile Su                                                                       | Thermo     |
| Ditiyotritol (DTT)                                                               | Sigma      |
| DNA Marker                                                                       | Thermo     |
| DNTP                                                                             | Thermo     |
| Etidyum Bromür                                                                   | Sigma      |
| Etil Alkol                                                                       | Sigma      |
| Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)                                               | Sigma      |
| Gliserol                                                                         | Sigma      |
| Hidroklorik Asit (HCl)                                                           | Sigma      |
| Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )                               | Sigma      |
| Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG)                                      | Sigma      |
| İmmersiyonyağı                                                                   | Sigma      |
| İzopropanol                                                                      | Sigma      |
| Kalsiyum Klorür (CaCl <sub>2</sub> )                                             | Sigma      |
| Lizozim                                                                          | Sigma      |
| Lügol                                                                            | Sigma      |
| Magnezyum Klorür (MgCl <sub>2</sub> )                                            | İnvitrogen |
| N,N,N'',N''-Tetrametilendiamin (TEMED)                                           | Sigma      |
| Promega WizardR Plus Minipreps DNA Purification Systems (Plazmit izolasyon kiti) | Promega    |
| Promega WizardR Plus Minipreps DNA Purification Kit (DNA İzolasyon Kiti)         | Promega    |
| RNaz A                                                                           | Invitrogen |
| Sodyum Hidroksit (NaOH)                                                          | Sigma      |

**Çizelge 3.2.** (devam)

|                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------|------------|
| Tris-HCl                                                       | Sigma      |
| 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl $\beta$ -D-Galactopyranoside (Xgal) | Sigma      |
| Coomassie Brilliant G-250                                      | Fluka      |
| Fosforik Asit                                                  | Sigma      |
| Bovin Serum Albumin                                            | Sigma      |
| 3-N-Morfolino Propansülfonik Asit (MOPS)                       | Sigma      |
| TSA (Tryptic Soy Agar)                                         | Lab M      |
| TSB (Tryptic Soy Broth)                                        | Lab M      |
| LB                                                             | Sigma      |
| Nutrient Broth                                                 | Oxoid      |
| Starch form rice                                               | Sigma      |
| Starch wheat                                                   | Sigma      |
| Starch form patato                                             | Sigma      |
| Formamid                                                       | Sigma      |
| Kloroform                                                      | Carlo Erba |
| Fenilmetansülfonilflorür (PMSF)                                | Sigma      |
| Sodyum Karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )                   | Carlo Erba |
| Trizma Base                                                    | Sigma      |
| Potasyum Fosfat Monobazik ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )         | Sigma      |
| D-Glukoz Monohidrat                                            | Sigma      |
| $\alpha$ -Siklodekstrin                                        | Sigma      |
| $\beta$ -Siklodekstrin                                         | Sigma      |
| Sodyum Hidroksit (NaOH)                                        | Sigma      |
| Potasyum Sodyum Tartarat (K-Na Tartarat)                       | Sigma      |
| Kloroform                                                      | Carlo Erba |

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler

**Çizelge 3.3.** Tez kapsamında deneylerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>DNS Çözeltisi</u> : 70 mL saf su içerisinde 1 g DNS ve 30 g sodyum potasyum tartarat çözüldü. Aynı bir beherde 20 mL saf suda 1,6 g NaOH çözülerek bu karışım DNS içeren çözeltiliye ilave edildi ve hacim 100 mL ye tamamlandı.                                                                                                 |
| <u>Substrat Çözeltisi</u> : Aktivite tamponu hazırlandıktan sonra içerisinde 100 mL için 2 g nişasta çözdürüldü.                                                                                                                                                                                                                    |
| <u>Sığır Serum Albumin (1 g/L) Çözeltisi</u> : 1 mg/mL olacak şekilde 0,05 g sığır serum albumin 50 mL saf suda çözülerek 4°C’de saklandı.                                                                                                                                                                                          |
| <u>Bradford Çözeltisi</u> : 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi alınarak 50 mL %95’lik etanolde çözüldü. Bu çözeltinin üzerine %95’lik 100 mL fosforik asit ilave edildikten sonra çözeltinin hacmi saf su ile 1 L’ye tamamlandı. Işık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığında muhafaza edildi. |
| <u>Sodyum Fosfat Tampon Çözeltisi (Aktivite Tamponu) (50mM)</u> : 0,6 g sodyum fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) tartılarak 90 mL saf suda çözüldü. pH metre yardımıyla pH 6,0’a ayarlandı. Hacim 100 mL’ye tamamlanıp 4°C’de saklandı.                                                                                          |
| <u>Lügol Solüsyonu</u> : 1 g iyot ve 2 g KCl tartılarak, son hacim saf su ile 100 mL’ye tamamlandı.                                                                                                                                                                                                                                 |
| <u>%70’lik EtOH</u> : 70 mL EtOH alınarak üzerine 30 mL saf su eklendi.                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <u>CaCl<sub>2</sub> Çözeltisi (100mM)</u> : 1,11 g CaCl <sub>2</sub> , 100 mL saf su içinde çözüldü, ağzı pamukla kapatılıp otoklavlandı ve kullanılıncaya kadar 4°C’de muhafaza edildi.                                                                                                                                            |

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Termofilik bakterilerin izolasyonu

Nevşehir kozaklı Grand Termal otelden alınan su örneği laboratuvar ortamına getirilerek sonraki çalışmalar için oda sıcaklığında muhafaza edildi. Su örneğimizden 200 mL alınarak üzerine uygun miktarda TSB ilave edildi ve 55°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı.  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ’lik dilüsyonlar hazırlandı ve karışık kültürden 1 mL alınarak, 9 mL fizyolojik su kullanılarak bir seri dilüsyon işlemi gerçekleştirildi. Herbir dilüsyon tüpünden 100µl kültür örneği alınarak, TSA besiyerine yayma ekim yöntemi ile aktarıldı ve 55°C’de bir gece inkübe edildi. Farklı koloni morfolojisine sahip olduğu düşünülen 11 izolat seçilerek, saf kültürleri hazırlandı ve stok kültür halinde kullanılıncaya kadar -86°C’de saklandı.

#### 3.2.2. Seçilen izolatların klasik yöntemlerle tanımlanması

Bakterilerin hücre morfolojileri, gram özellikleri, katı ortamlardaki koloni morfolojileri, elde edilen izolatların tuz konsantrasyonları, büyüme sıcaklıkları, pH değeri ve katalaz, oksidaz üretim potansiyelleri gibi özellikleri araştırıldı (Adıgüzel 2006).

##### 3.2.2.a. Seçilen izolatların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Seçilen izolatların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla stoktan alınan izolatlar 3 faz çizgi ekimi ile TSA besiyerine aktarıldı ve 55°C’de 1 gece inkübe edildi. Gelişen kolonilerden alınan örnekler mikroskopta incelendi. Bu sayede bakterilerin morfolojik özellikleri tespit edildi.

## 1. Gram Boyama

Bakteriler hücre duvarlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre gram pozitif ve gram negatif olarak 2 gruba ayrılırlar. Gram reaksiyon testi 2 farklı yöntemle gerçekleştirilmektedir. Birinci yöntemde; temiz bir lam üzerine 24 saatlik bakteri kültüründen alınan örnek yardımıyla smear preparat hazırlanır. Hazırlanan preparat kristal violet boyası ile 1 dk boyanır. Boya bakteriye nüfuz eder ve hem gram pozitif hem gram negatif bakteriler mor renge boyanır. Süre sonunda fazla boya preparattan su ile uzaklaştırılır. Daha sonra preparatın üzerine sabitleştirici olarak lügol eklenir ve 1 dk bekletilir. Süre sonunda preparat %96'lık etanol ile yıkanır. Gram pozitif bakteriler peptidoglikan tabakalarının kalın olması nedeniyle kristal violet-lügol kompleksini tutmaya devam eder ve mor renkte kalırlar. Alkol muamelesi sonunda gram negatif bakterilerin hücre membranları bozulur ince peptidoglikan tabakası boya kompleksini tutamaz ve renksizleşir. Yıkama sonrasında saf sudan geçirilen preparat safraninle 20 sn boyanır. Süre sonunda saf su ile dikkatlice yıkanan preparat kurutulur ve immersiyon objektifinde incelenir. Mor renkte görülen hücreler gram pozitif, pembe-kırmızı renkte görülen hücreler ise gram negatif olarak tanımlanır (Johnson and Case 2007; Acar 2009).

İkinci yöntemde bakteriler %3'lük potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi ile muamele edilir. KOH çözeltisi ile muamele sonucunda gram negatif bakterilerin hücre duvarı parçalanır sitoplazma, nükleer materyal açığa çıkar ve viskoz bir yapı oluşur. Lam üzerine damlatılan KOH çözeltisi TSA besiyerinde büyütülen 24-48 saatlik kültürden bir öze dolusu bakteri ile etkileştiğinde öze aşağı yukarı hareket ettirilir. Viskoz yapının oluşması durumunda bakteriler gram negatif, oluşmaması halinde bakteriler gram pozitif olarak tanımlanır (Saygılı *et al.* 2006).

### **3.2.2.b. Seçilen izolatların fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi**

#### **1.İzolatların gelişebildikleri tuz konsantrasyonunun belirlenmesi**

İzolatlar için gelişmenin olduğu tuz aralığının belirlenmesi amacıyla farklı tuz konsantrasyonlarına (%2, %4, %6, %8, %10 ve %12'lik) sahip TSB besiyeri hazırlandı. İzolatlar farklı tuz konsantrasyonlarına sahip besiyerine inoküle edildi ve 55°C'de çalkalamalı inkübatörde 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süreleri sonunda spektrofotometrede OD<sub>600</sub>'de ölçüm yapıldı (Holzapfel and Schillinger 1992).

#### **2.İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi**

İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi için TSB besiyerlerine inokülasyon yapıldı. İzolatlar farklı sıcaklıklarda (35°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C) inkübasyona bırakıldı. 24-48 saat süreli inkübasyon sonucunda gelişimin görüldüğü minimum, maksimum ve optimum büyüme sıcaklıkları belirlendi. Bunun için spektrofotometrede OD<sub>600</sub>'de ölçüm gerçekleştirildi (Facklam *et al.* 2002).

#### **3.İzolatların gelişim gösterdikleri pH aralıklarının belirlenmesi**

İzolatlar için pH aralığının belirlenmesinde öncelikle farklı pH değerlerine (pH 3,0 pH 5,0 pH 7,0 pH 9,0 pH 11,0) sahip TSB besiyeri hazırlandı. İzolatlar TSB besiyerine inoküle edildi ve 55°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda spektrofotometrede OD<sub>600</sub>'de ölçüm yapılarak izolatların gelişim gösterdikleri minimum ve maksimum pH aralıkları tespit edildi (Tekinşen *et al.* 2002).

### 3.2.2.c. Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

#### 1. Katalaz testi

Katalaz testi ile izolatların katalaz enzimine sahip olup olmadıkları belirlendi. Katalaz enzimi elektron transfer zinciri sonunda açığa çıkan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'i parçalayarak  $H_2O$  ve  $O_2$  oluşumuna neden olur. Açığa çıkan  $O_2$  gazı kabarcıklar şeklinde görülebilir. Katalaz enzim varlığının araştırılması amacıyla izolatlar TSA besiyerine inoküle edilerek 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. TSA besiyerinde büyütülen bakterilerden bir öze dolusu alınarak lam üzerine konuldu. Daha sonra %5'lik  $H_2O_2$  bir damla şeklinde lam üzerine bırakıldı. Öze yardımıyla dairesel hareketler şeklinde  $H_2O_2$ 'nin bakteri içerisine nüfuz etmesi sağlandı ve kabarcık oluşup oluşmaması durumu gözlemlendi. Kabarcık oluşumuna neden olan bakteriler katalaz pozitif, kabarcık oluşturmayan bakteriler katalaz negatif olarak belirlendi (Arda 2000; Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006).

#### 2.Oksidaz testi

Oksidaz testi ile izolatların elektron transferinde görevli sitokrom c proteinine sahip olup olmadıkları belirlendi. Sitokrom c (oksidaz c) proteini mitokondride yer alan büyük bir transmembran proteindir. Solunumda görev alan dört sitokrom c molekülünün her birinden birer elektron alarak bunları bir oksijen molekülüne transfer eder ve iki tane su molekülü açığa çıkarır. Elektron transfer zincirinde hücresel enerji oluşumuna neden olur. Kısacası sitokrom c proteini elektron transfer sisteminin terminal elektron alıcısıdır. Organizmanın sitokrom c (oksidaz c) enzimine sahip olması halinde reaksiyon sonucu mavi renk oluşumu gözlenir. Bu test için %1 Tetra methyl-p-phenyldiamine dihydrochloride içeren kit halindeki diskler kullanıldı. Bu diskler 1 damla steril saf su ile doyurulup, üzerine TSA besiyerinde geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu eklendi. İzolatlarda sitokrom c proteini olması halinde, diskteki kodlu olan substratıyla reaksiyona girdi ve mavimsi mor bir renk oluşumuna neden olduğu belirlendi. Mavi mor renk oluşması durumunda bakteri

oksidaz pozitif; renk değişiminin görülmemesi durumunda ise bakteri oksidaz negatif olarak değerlendirildi (Harley and Prescott 2002; Adıgüzel 2006; Acar 2009).

### **3.2.3. Bakterilerin moleküler yöntemlerle tanılarının yapılması**

#### **3.2.3.a. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması**

##### **1.Genomik DNA İzolasyonu**

DNA izolasyonu için Promega Wizard® Genomic DNA purifikasyon kit (A2360) protokolü kullanıldı.

##### **DNA İzolasyonu**

- Test izolatları TSA besiyerinde canlandırıldıktan sonra, saf tek bir koloni alınarak TSB besiyerine aktarıldı ve 13000-15000 rpmde 5 dk santrif lenerek, süpernatant atıldı.
- Çöktürülen hücreler 50 mM 480  l (pH:8) EDTA içerisinde çözdürüldü.
- 10 mg/mL 120  l lizozim ilave edildi ve pipetlenerek karıştırıldı. Karışım 37 C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Elde edilen karışım 13000 rpmde 2 dk santrif lenerek süpernatant atıldı. 600  l N clei lysis solution eklendi. Hafifçe pipetajlandı.
- 80 C’de 5 dk inkübe edildi. Oda sıcaklığında bir kaç dk soğutuldu ve 3  l RNaz eklenerek 2-5 kez alt üst edildi. 37 C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı.
- Karışım oda sıcaklığında soğutuldu ve 200  l protein presipitasyon solüsyonu eklendi. 20 sn vortekslenerek 5 dk buza bırakıldı. 13000 rpmde 30 sn santrif lendi.
- Süpernatant alınarak içerisinde oda sıcaklığında 600  l izoproponol bulunan tüplere bırakıldı. Ependorfda pellet oluşuncaya kadar alt üst edildi.
- 13000 rpmde 2 dk santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atıldı ve kurutma kağıdı yardımıyla sıvı iyice uzaklaştırıldı.

- Ependorflara 600 µl %70'lik etanol eklendi ve iyice alt üst edildi. 13000 rpmde 2 dk santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpte etanol kalmaması için 37°C'de 15-20 dk inkübe edildi.
- Ependorf tüpe 100 µl DNA rehidrasyon solüsyonu eklendi ve 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ara ara tüplerin dibine vuruldu.
- Elde edilen DNA 4°C'de saklandı.

#### **1.a. DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması**

DNA miktarı, 260 nm'deki absorbans ölçümüyle belirlenirken, genetik materyalin protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm'de okunan absorbans değeriyle tespit edildi. Kuvarz küvet içerisine 998 µl TE çözeltisi konularak 260 nm spektrofotometrede absorbans değeri ölçüldü ve okunan değer kör olarak kaydedildi. Daha sonra küvete 2 µl DNA ilave edilerek karışımın homojen olması sağlandı ve 260 nm'de köre karşı absorbans ölçüldü. Okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA'nın absorbans değeri bulundu. Yapılan işlemlerin aynısı 280 nm için tekrarlandı.  $A_{260}$  ve  $A_{280}$  değerlerine bakıldı  $A_{260}/A_{280}=1-1,7$  olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanıldı (Adıgüzel 2006).

#### **1.b. DNA örneğinin ve çalışma solüsyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi (µg/mL)**

DNA Konsantrasyonu (µg/mL)= $A_{260}$ xSeyreltme Faktörü (500)x50 (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak, stok solüsyonun DNA konsantrasyonu belirlendi.

DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ise; İstenen Konsantrasyon (100ng/µl) x İstenen Hacim (200 µl) / Stok DNA Konsantrasyonu (µg/mL) formülü ile belirlendi. Belirlenen değer stok DNA çözeltisinden alınarak, TE çözeltisi ile 200 µl'ye tamamlandı. 100 ng/µl konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu olarak kullanıldı.

DNA tüpleri -86°C’de sonraki çalışmalarda kullanılıncaya kadar muhafaza edildi (Adıgüzel 2006).

## 2. 16S rRNA PCR işlemi

Birçok canlıda korunmuş olan 16S rRNA gen bölgesi bakteri sistematığı açısından da oldukça önemlidir. Bu dizi için seçilen primerlerle in vitro koşullarda 16S rRNA gen bölgesi çoğaltıldı.

### 2.a. 16S rRNA PCR Reaksiyonun Hazırlanması

Öncelikle PCR’ı yapılacak her bir örnek için, 30 µl’lik reaksiyon karışımı hazırlandı ve reaksiyon ortamına son olarak 3µl kalıp DNA (100 ng) eklenerek son hacim 30 µl’ye (Çizelge 3.4) tamamlandı (Adıgüzel 2006).

**Çizelge 3.4.** 16S rRNA PCR işleminde kullanılan reaktiflerin konsantrasyonları ve miktarları

| Reaktif            | Konsantrasyon | Miktar (µl) |
|--------------------|---------------|-------------|
| PCR Buffer (Sigma) | 10X           | 3           |
| Dntp               | 25mM          | 0,6         |
| MgCl <sub>2</sub>  | 25Mm          | 1,8         |
| 27F                | 5pmol         | 3           |
| 1492R              | 5pmol         | 3           |
| DMSO               | %99           | 1,2         |
| ddH <sub>2</sub> O | —             | 14,4        |
| DNA                | 100ng         | 3           |

**PCR Programı:** Örnekler PCR cihazına bırakıldı ve PCR programı aşağıdaki şekilde programlandı.

- 94°C’de 2 dk (Denatürasyon)
  - 94°C’de 1 dk (Denatürasyon)
  - 49°C’de 1 dk (Bağlanma)
  - 72°C’de 1 dk (Uzama)
  - 72°C’de 2 dk (Uzama)
- 36 Döngü

### 2.b. 16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi

Jel elektroforezi için 0,8 g agaroz tartılarak üzerine 80 mL 1X TAE (%1’lik agaroz jel) tamponu ilave edildi, karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatıldı. Daha sonra jel 50°C’ye kadar soğutuldu ve üzerine 4 µg/mL etidyum bromür dikkatli bir şekilde eklendi. İçerisine önceden tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 30-35 dk beklendi ve jelin donması sağlandı. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra jel içerisinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk kuyucuğa, 10 kb DNA markırından [10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 800, 900, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100] (Biolabs-N0550S) 3 µl, diğer kuyulara ise her bir örnek için; 2,5 µl 6X yükleme tamponu ve 5 µl PCR ürünü karışımı yüklendi. Örnekler elektroforez jel düzeneği yardımıyla 120 voltta 120 dk yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenerek bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi.

### 3. Kompetent hücrenin hazırlanması

- ✓ *E.coli* JM101 suşu stoktan canlandırıldıktan sonra bu kültürden tek bir koloni alınarak, LB broth besiyerine aktarıldı ve 1 gece 37°C’de inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Süre sonunda kültürden 300 µl alınarak, 2700 µl su ile seyreltildi ve 600 nm’de ölçüm yapıldı. Çıkan sonuç seyreltme katsayısı ile çarpılarak mL cinsinden alınması gereken kültür miktarı belirlendi.
- ✓ LB broth üzerine OD 600 = 0,1 olacak şekilde ön kültür eklendi ve 37°C’de 60-90 dk inkübe edildi.

- ✓ Bu süre zarfı içerisinde OD 600= 0,6 olacak şekilde aralıklarla ölçümler yapıldı.
- ✓ 0,6 değerini bulduğumuz noktada kültür inkübatörden çıkarılarak, 4400 rpm'de 5-10 dk süre ile santrifüjlendi.
- ✓ Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre çökeltisi üzerine 2500 µl CaCl<sub>2</sub> eklenerek, tüpe hafifçe vurularak çözünmesi sağlandı.
- ✓ 30-45 dk buzda bekletildi.
- ✓ Süre sonunda 4°C'de 10 dk 4400 rpmde santrifüj yapılarak süpernatant atıldı.
- ✓ Çökeleğin üzerine 500 µl CaCl<sub>2</sub> eklendi ve pipetajlanarak çözdürüldü. Buzdolabında 12 saat bekletildi.
- ✓ Elde edilen hücreler en geç 3 gün içerisinde kullanılmak üzere saklandı.

#### 4. Ligasyon İşlemi

5 µl 2x ligasyon buffer

3 µl PCR ürünü

1 µl vektör (1:1 sulandırılmış)

1 µl T4 DNA ligaz (en son eklendi).

Karışım 1 gece (16 saat) 16°C'de bekletildi. Süre sonunda ürün kullanılıncaya kadar 4°C'ye kaldırıldı.

#### 5. Transformasyon

- ✓ Her bir efendorf tüpüne 4°C'de bir gece bekletilen kompetent hücreden 200'er µl konuldu.
- ✓ Üzerine 5 µl ligasyon ürünü eklendi ve 30 dk buzda inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 42,5°C'ye ayarlı su banyosunda 2 dk süre ile sıcaklık şokuna maruz bırakıldı.
- ✓ Tüplere 200 µl LB eklendi. 1 saat veya 1 saat 40 dk, 37°C'de bekletildi.
- ✓ Daha sonra kültürün üst fazı, LB agar + Amfisilin + X-gal + IPTG içeren besiyerine yayma ekim yöntemi ile aktarıldı.

✓ Petriler 37°C’de yaklaşık 12-14 saat inkübe edildi.

#### 5.a. Koloni seçme ve sıvı kültüre alma

Her petriden beyaz koloniler seçilerek, içerisinde 3 mL LB ve amfisilin karışımı bulunan tüplere aktarıldı ve 1 gece 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

#### 6. Koloni PCR

1 gece 37°C’de inkübe edilen deney tüplerinde ki kültürden 4 µl alınarak, 16 µl steril saf su bulunan ependorf tüplere aktarıldı. 10 dk kaynar su banyosunda tutulan tüpler 2 dk buzda bekletilerek ısı şokuna bırakıldı ve 5 dk 12000 rpm’de santrifüjlendi. Ardından elde edilen süpernatant ile PCR işlemi gerçekleştirildi. Reaksiyon şartları;

- 16,1 µl dH<sub>2</sub>O
- 3 µl MgCl<sub>2</sub> içerikli tampon
- 0,6 µl dNTP mix
- 1,8 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 2’şer µl 5 µM primer [T7 (5’-AATACGACTCACTATAG–3’) ve SP6 (5’–ATTTAGGTGACACTATAG–3’)]
- 0,3 µl Taq DNA polimeraz
- 1,2 µl DMSO
- 3 µl süpernatant’dan oluşmaktadır.

**PCR Programı:** Örnekler PCR cihazına yerleştirildi. Koloni PCR için cihaz aşağıdaki şekilde programlandı.

- 94°C’de 2 dk (Denatürasyon)
  - 94°C’de 30 s (Denatürasyon)
  - 55°C’de 30 s (Bağlanma)
  - 72°C’de 2 dk (Uzama)
  - 72°C’de 10 dk (Uzama)
- 35 Döngü

%1’lik agaroz jele, markır, içerisinde istenilen geni içeren (pozitif) ve içerisinde gen bulunmayan (negatif) kontroller yüklenerek 90 voltta 1 saat süre ile yürütüldü.

İstenilen geni taşıyan koloniler, görüntüleme cihazından PCR görüntülerine göre seçilerek, plazmit izolasyonu için amfisilinli LB broth’a ekildi.

## 7. Plazmit İzolasyonu

Promega (A1330) izolasyon kiti kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi.

- 1-5 mL bakteri kültürü, 5 dk süre ile 10,000g’de santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 250 µl hücre süspansiyon solüsyonu eklendi ve pipetajlandı.
- 250 µl lizis solüsyonu eklendi ve tüpler 4 kez alt üst edilerek, 1-5 dk inkübe edildi.
- 10 µl alkalın proteaz solution eklendi, 20 kez alt üst edildi ve 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- 350 µl nötralizasyon solüsyonu ilave edilerek, 4 kez alt üst yapıldı.
- Baktariyel lizat oda sıcaklığında maksimum hızda 10 dk santrifüjlendi.
- Spin kolon tüpe yerleştirildi.
- Süpernatant dikkatlice alınarak spin klona aktarıldı, fakat pellete dokunulmadı.
- Oda sıcaklığında maksimum hızda 1 dk santrifüjlendi ve spin kolon çıkarıldı.
- Toplama tüpü döküldükten sonra spin kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
- 750 µl kolon yıkama solüsyonu ilave edildi.

- Maksimum hızda ve oda sıcaklığında 1 dk süre ile santrifüj yapıldı. Ardından spin column çıkarıldı ve toplama tüpü döküldü. Spin kolon tekrar takıldı.
- Yeniden 250 µl kolon yıkama solüsyonu eklendi.
- Oda sıcaklığında ve maksimum hızda 2 dksüre ile santrifüj edildi.
- Spin kolon yeni steril 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne alındı. Dikkat edilmesi gereken nokta spin kolonda, kolon yıkama solüsyonu kalmamalıdır, eğer varsa da 1 dk daha santrifüj edilmelidir.
- Spin kolon mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- Spin kolonun üzerine plazmid DNA'sının elüsyonu için 100 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve maksimum hızda 1 dk santrifüj yapıldı. Spin kolon uzaklaştırıldı ve DNA kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### **Plazmitlerin Kontrolü ve Konsantrasyonlarının Ölçülmesi**

İzole edilen plazmitler EcoR I ile kesilerek, agaroz jelde yürütüldü. Jel görüntülemesi sonucunda 1400-1500 bp'lik bölgede bant veren örnekler pozitif olarak kabul edildi.

### **Plazmit konsantrasyonlarının ölçülmesi**

Herbir plazmit örneğinden 2 µl alınarak, içerisinde 998 µl saf su bulunan küvete aktarıldı ve 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede absorbans ölçümüne gidildi.

$A_{260} \times 50 \text{ (sabit)} \times 500 \text{ (dilüsyon oranı)} = 100-200 \text{ ng olmalıdır.}$

Uygun konsantrasyona sahip plazmitlerden 30-50 µl alınarak, örnekler sekans analizi için MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi.

### 3.2.3.b. rep-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

#### 1. BOX-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

Genomik parmak izi analizi için kullanılan yöntemlerden biri de BOX-PCR yöntemidir. PCR yapılacak her bir örnek için;

- 12,7 µl ddH<sub>2</sub>O
- 5 µl 10X Buffer
- 2,5 µl DMSO
- 1,25 µl BSA
- 1,25 µl dNTP(deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10Mm
- 4 µl primer BOX A1R (5"-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3")
- 0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz
- 3 µl kalıp DNA (70 ng/µl) kullanılarak 30 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı (Adıgüzel 2006).

#### PCR programı:

95°C'de 7 dk (Denatürasyon)

94°C'de 1 dk (Denatürasyon)

53°C'de 1 dk (Bağlanma)

65°C'de 8 dk (Uzama)

65°C'de 16 dk (Uzama)

35 Döngü

PCR işlemi sonrasında elektroforez jel 90 voltta 120 dk yürütüldü. DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenerek bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analizleri gerçekleştirildi.

## 2. (GTG)<sub>5</sub>-PCR Yöntemiyle Bakterilerin Gen Profillerinin Belirlenmesi

Genomik parmak izi analizi için kullanılan yöntemlerden biri de (GTG)<sub>5</sub>-PCR yöntemidir. Her bir örnek için;

12,7 µl ddH<sub>2</sub>O

5 µl 10X Buffer

2,5 µl DMSO

1,25 µl BSA

1,25 µl dNTP(deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

4 µl primer GTG5 (GTG GTG GTG GTG GTG)

0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz

3 µl kalıp DNA (70 ng/µl)

kullanılarak 30 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı ve PCR işlemi gerçekleştirildi (Adıgüzel 2006).

### PCR programı:

95°C'de 7 dk (Denatürasyon)

94°C'de 1 dk (Denatürasyon)

53°C'de 1 dk (Bağlanma)

65°C'de 8 dk (Uzama)

65°C'de 16 dk (Uzama)

35 Döngü

%1'lik agaroz jel hazırlanarak, ilk kuyucuğa 10 kb'lık DNA markır [10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 800, 900, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100] (N0550S- Biolabs)) 10 µl yüklendi. Diğer kuyucuklara her bir örnek için 2,5 µl 6X yükleme tamponu ve 5 µl PCR ürünü karışımı yüklendi. Jel düzeneği 90 voltta 120 dk yürütüldü ve jeldeki bantlar görüntüleme sistemi ile analiz edildi.

### 3.2.4. Ekstraselüler amilaz sentezleyen mikroorganizmaların belirlenmesi

Amilaz enzimini üreten bakteri izolatlarının seçimi için stok bakteriler TSA besiyerine üç faz ekim yapıldı ve 55°C’de etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı. Gelişim gösteren saf koloniler öze yardımıyla alındı, karbon kaynağı olarak ham patates nişastası ve nutrient agar içeren besiyerine çizgi ekim yapıldı (Behera *et al.* 2014). Bir gece 55°C’de inkübe edilen izolatların ekstraselüler amilaz sentezlemeleri durumunda petrideki ham nişastayı parçalamaları ön görüldü. Bu amaçla besiyerlerine dökülen lügolün koloniler etrafında şeffaf zonlar oluşturması beklendi. Koloniler etrafında oluşan zonların çapı ölçülerek en fazla amilaz enzimi sentezleyen bakteri suşu belirlendi. Daha sonraki çalışmalar için bu bakteri suşu kullanıldı.

### 3.2.5. Amilaz enzim aktivitesinin tayini

Enzim aktivitesi tayini indirgen şeker tayini yöntemi olan 3,5-dinitrosalisilik asit metodu (DNS) kullanılarak yapıldı. Enzim aktivitesi için, dakikada 1 µM glukoz açığa çıkaran enzim miktarı bir ünite olarak tanımlanmıştır (Miller 1959).

- 150µl aktivite tamponu ve 300 µl nişasta çözeltisi 5 dk 70°C’de ön ısıtma yapıldı.
- 500 µl enzim eklenerek 70°C’de 20 dk inkübe edildi.
- 600 µl DNS çözeltisi ilave edildi ve 5 dk 90°C’ye bırakıldı.
- 540 nm’de absorbands değeri ölçüldü.

### 3.2.6. Glukoz standart grafiği

Amilaz enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılacak olan glukoz standart grafiğinin oluşturulması amacıyla 0,673 mg/mL konsantrasyonda stok glukoz çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden belirli oranlarda seyreltmeler yapılarak Çizelge 3.5’de görüldüğü şekilde hazırlanan 10 farklı konsantrasyondaki glukoz çözeltisi için DNS metodu ile aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre 540 nm’deki absorbands

değerinde meydana gelen değişimi gösteren standart grafik çizildi.

**Çizelge 3.5.** Glukoz standardının tüplere dağılımı

|                        | 0<br>(kör) | 1         | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         | 7         | 8         | 9         | 10         |
|------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Glukoz<br>(0,673mg/mL) | –          | 100<br>μl | 200<br>μl | 300<br>μl | 400<br>μl | 500<br>μl | 600<br>μl | 700<br>μl | 800<br>μl | 900<br>μl | 1000<br>μl |
| dH <sub>2</sub> O (μl) | 1000<br>μl | 900<br>μl | 800<br>μl | 700<br>μl | 600<br>μl | 500<br>μl | 400<br>μl | 300<br>μl | 200<br>μl | 100 μ     | –          |

### 3.2.7. Protein tayini

Protein tayini Bradford yöntemi ile yapıldı ve protein standartı olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası proteindeki pozitif yüke bağlanır. Protein-boya kompleksi, çözeltilerde uzun süre kalır. Oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans gösterir. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşmesini sağlamaktadır. Bradford yönteminin hassasiyeti 1-100 μg arasındadır. (Bradford 1976).

Standart grafiği oluşturmak amacıyla 1 mg/mL standart sığır albumin çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden ayrı tüplere sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μl şeklinde dağıtıldı, saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL’ye tamamlandı. Tüplere 4900 μl renklendirme reaktifi ilave edilerek vortekslendi. 10 dk sonra spektrofotometrede 595 nm’de absorbans değerleri okunarak kaydedildi. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılan örnekler için aynı yöntem uygulanarak standart grafikten miktar tayini yapıldı.

### 3.2.8. Homojenatın hazırlanması

*Bacillus* cinsi bakterilerde, organizma substratın bulunduğu ortama inoküle edildiği andan itibaren enzim sentezi başlar ve sentezlenen enzimler hücre dışına salınır. İstenilen üreme fazına ulaştıktan sonra, santrifüjleme veya filtrasyon tekniği kullanılarak bakteri ve oluşan ürün birbirinden ayrılır. Salgılanan enzim organizmanın uzaklaştırılması sonucu elde edilen üst sıvıda (süpernatant) bulunur.

*B. licheniformis* SO7 suşundan alınan hücreler 6000 rpmde 30 dk santrifüj edilerek çökelek uzaklaştırıldı. Elde edilen homojenat enzim saflaştırma çalışmalarında kullanıldı.

### 3.2.9. Nişasta afinite metodu ile amilaz enziminin saflaştırılması

Ham nişastayı hidrolizleyen  $\alpha$ -amilazların ham nişastayı adsorblama yeteneğine sahip olduğu farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Balkan 2008). Amilaz enziminin farklı ham nişastalara tutunma yeteneği araştırıldı. Bunun için öncelikle 5 mL enzim; %1'lik ham pirinç, buğday ve mısır nişastalarının 1 mL'si ile karıştırılarak 4°C'de 30 dk. bekletildi ve 4°C'de 11000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatantta aktivite tayini yapılarak başlangıç enzim aktivitesi ile karşılaştırılıp aşağıdaki formülden tutunma oranları belirlendi (Goyal *et al.* 2005).

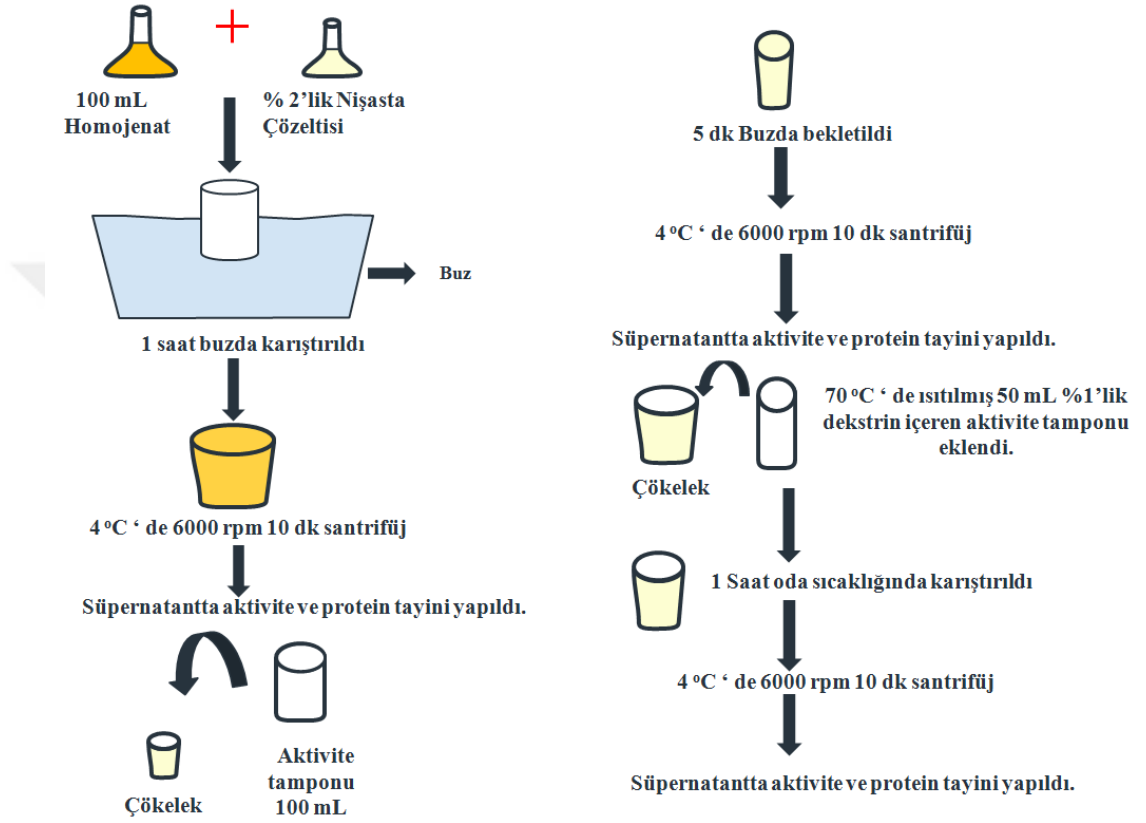
$$TO(\%) = \frac{A - B}{B} \times 100$$

TO (%): Tutunma oranı

A: Başlangıç amilaz enzimi aktivitesi

B: Süpernatantın amilaz enzim aktivitesi

Amilaz enziminin saflaştırılması Najavi and Kembhavi (2005), tarafından kullanılan yöntemin modifiye edilmesiyle yapıldı. Tutunma yüzdesi yüksek olan ham nişasta seçildikten sonra saflaştırma prosedürü Şekil 3.1'deki gibi gerçekleştirildi.



**Şekil 3.1.** SO7  $\alpha$ -amilaz enzimi saflaştırma prosedürü

### 3.2.10. Diyaliz

Diyaliz yöntemi, iyonik ve iyonik olmayan tüm küçük molekülleri uzaklaştırmak için basit, ucuz ve etkili bir yöntemdir. Genellikle çözeltilerdeki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdan uzaklaştırmak için kullanılır. Ayrıca biyolojik moleküllere zayıf bir şekilde bağlı olan küçük iyonları ve molekülleri de bu yöntemle ortamdan uzaklaştırmak mümkündür (Metin 2007).

Nişasta afinite metoduyla saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi diyaliz torbasına koyularak 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) 3-5 saat diyaliz edildi. Diyaliz işleminden sonra aktivite ve protein tayini yapıldı.

### 3.2.11. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin saflık kontrolü, molekül ağırlığının tayini ve Zimogram Analizi

#### 1. SDS – PAGE

Saflaştırılan amilaz enziminin saflık derecesi ve molekül ağırlığı Laemmli (1970) yöntemine göre SDS-PAGE ile tayin edildi.

#### 1.a. SDS-PAGE ve Gümüş Boyamada Kullanılan çözeltiler

|                                                  |                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1 M Tris-HCl (pH 8,8)</b>                     | 12,11g Tris tartılarak 80 mL saf suda çözüldü ve 1 M HCl ile pH 8,8 'e ayarlanarak hacim 100 mL tamamlandı.                 |
| <b>1 M Tris-HCl (pH 6,8)</b>                     | 12,11 g Tris tartılarak 80 m L saf suda çözüldü ve 1 M HCl ile pH 6,8'e ayarlanarak hacim saf suyla 100 mL tamamlandı.      |
| <b>%30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi</b> | 15 g akrilamid ve 0,4 g bisakrilamid 34,6 mL saf su içerisinde çözümlenerek hazırlandı.                                     |
| <b>%10'luk Amonyum persülfat çözeltisi</b>       | 1 g amonyum persülfat tartılarak hacim saf su ile 10 mL tamamlandı.                                                         |
| <b>%10'luk SDS</b>                               | 1 g SDS alınıp 9 mL saf suda çözüldü ve son hacim 10 m L'ye tamamlandı.                                                     |
| <b>Yürütme tamponu</b>                           | 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin tartılarak 450 mL saf suda çözüldü hazırlanan %10'luk SDS çözeltisinden 5 mL ilave edilerek pH |

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                       | 8,3'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 500 mL olacak şekilde tamamlandı.                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Numune tamponu</b> | 1 M Tris-HCl (pH 6,8)'dan 0,5 mL ve %10'luk SDS çözeltisinden 1mL alındı. Üzerine 1 mL gliserol ve %0,1'lik bromtimol mavisi eklenerek hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Tampon kullanılmadan önce 950 µl numune tamponu 50 µl β-merkaptoetanol ilave edilerek kullanıldı. Zimogram analizi için numune tamponu SDS ve β-merkaptoetanol içermeyecek şekilde hazırlandı. |

|                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ayırma Jeli:</b><br>5000 µl Tris HCl pH 8,8<br>4400 µl AA-bis AA<br>3130 µl saf su<br>200 µl SDS<br>130 µl TEMED<br>70 µl Amonyum persülfat |
| <b>Yığma Jeli:</b><br>410 µl Tris HCl pH 6,8<br>440 µl AA-bis AA<br>2450 µl saf su<br>30 µl SDS<br>30 µl TEMED<br>50 µl Amonyum persülfat      |

- **Örneklerin Hazırlanması**

Örneklerden 20 µl alınarak üzerine 20 µl numune tamponu eklendi. Standart olarak seçilen protein markerdan 5 µl alınarak 15 µl numune tamponu ile karıştırıldı. Hazırlanan örnekler kısa süreli vorteksledikten sonra 90°C’de 5 dk bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandı. Daha sonra örnekler jele yüklendi.

Jeller dökülüp polimerize olduktan sonra hazırlamış olduğumuz örnekler ve protein markerı kuyulara yüklendi. Tank 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile doldurularak jel kasetleri yerleştirildi. Bantlar ayırma jeline geçene kadar 80 voltta 30 dk daha sonra 120 voltta 90 dk yürütüldü. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra çıkarılan jel önce tespit çözeltisiyle ardından sırasıyla redüksiyon çözeltisi, boyama çözeltisi ve yıkama çözeltileri ile muamele edilerek görüntülendi.

### **Gümüş Boyamada Kullanılan Yöntem ve Çözeltiler**

**Tespit çözeltisi:** 60 mL saf su, 30 mL %96’lık saf etanol, 10 mL asetik asit karıştırıldı. Jel 30 dk tespit çözeltisiyle çalkalayıcıda inkübe edildi.

**Redüksiyon çözeltisi:** 80 mL saf su ve 45 mL saf etanol karıştırıldı. Karışıma 4,8 g sodyum asetat eklendi pH asetik asit yardımıyla 6,0’ya ayarlandı. Daha sonra 0,15 g sodyum tiyosülfat ve 4 mL glutaraldehit eklendi. Hacim saf su ile 150 mL’ye tamamlandı. Jel 30 dk redüksiyon çözeltisiyle çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası jel 3 kez 5’er dk saf su ile yıkandı.

**Boyama çözeltisi:** 100 mL saf su, 20 µl formaldehit, 0,1 g AgNO<sub>3</sub> karanlık ortamda karıştırıldı 20 dk boyunca çalkalayıcıda jelle muamele edildi.

**Yıkama çözeltisi:** 3,75 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 270 mL saf su ile karıştırıldı üzerine 120 µl formaldehit eklendi. Jel üzerinde marker ve bantlar görülünceye kadar çalkalama

yapıldı. Önemli nokta çalkalama işlemi çok uzun tutulduğu takdirde jelde  $\text{AgNO}_3$  kaynaklı kararına meydana gelecektir.

### **1.b. SDS-PAGE İle *B. licheniformis* SO7 Amilaz Enziminin Molekül Ağırlığının Hesaplanması**

Saflaştırma sonucu elde edilen enzimin saflığının kontrolü ve molekül ağırlığının tayini için SDS-PAGE analizi yapıldı. SDS-PAGE sonrası elde edilen jel üzerinde standart proteinlerin ve enzimin jel üzerinde yürüdükleri mesafeler ölçülerek  $R_f$  değeri hesaplandı. Standart proteinlerin log MA değerlerine karşı  $R_f$  değerleriyle bir grafik çizildi. Bu grafik sayesinde  $\alpha$ -amilazın molekül ağırlığı hesaplandı.

$$R_f = \text{Protein bandının aldığı yol} / \text{İşaret boyanın aldığı yol}$$

### **2. $\alpha$ -Amilaz Enziminin Zimogram Analizi**

Zimogram analizi Yang *et al.* (2004) kullandığı yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra SDS-PAGE jeli %2.5'luk (v/v) TritonX-100 solüsyonu ile 30 dk hafifçe çalkalanarak ortamdaki SDS uzaklaştırıldı. Daha sonra saf su ile iki kez yıkama yapıldı. %1'lik nişasta içeren (w/v) 50 mM'lık pH 7,0 sodyum fosfat tamponu içerisinde  $55^\circ\text{C}$ 'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası jel saf su ile yıkandı ardından bantlar görülene kadar iyodin solüsyonu ile boyama işlemi yapıldı.

**İyodin solüsyonu:** %50(v/v) metanol, %1 (w/v) iyodin, %10 (w/v) potasyum iyodit.

### **3.2.12. *B. licheniformis* SO7 $\alpha$ -amilaz enziminin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi**

#### **3.2.12.a. $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum pH aralığının belirlenmesi**

*B. licheniformis* SO7 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi amacıyla 50 mM farklı pH değerlerine sahip sodyum asetat (pH 3,0-5,0), sodyum fosfat (pH 6,0-7,0), Tris-HCl (pH 8,0-9,0), Glisin-NaOH (pH 10,0-12,0) tamponları ve bu tamponlarda hazırlanan %2'lik nişasta çözeltisi kullanıldı. Bölüm 3.2.5'de anlatıldığı gibi aktivite tayini yapıldı. Enzimin pH profili belirlenirken en yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağlı aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı.

#### **3.2.12.b. $\alpha$ -amilaz enzimi için stabil pH aralığının belirlenmesi**

$\alpha$ -amilaz enziminin stabil olduğu pH aralığının belirlenmesi için 50 mM sodyum asetat (pH 3,0-5,0), sodyum fosfat (pH 6,0-7,0), Tris-HCL (pH 8,0-9,0), Glisin-NaOH (pH 10,0-12,0) tamponları kullanıldı. Enzim ve tampon 55°C'de 1 saat ve 4°C'de 1 gece inkübe edilerek bölüm 3.2.5 anlatıldığı şekilde aktivite tayini yapıldı. İnkübasyon öncesi 25°C oda sıcaklığında  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi. İnkübasyon süresi sonunda elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi.

#### **3.2.12.c. $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesi**

*B. licheniformis* SO7 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi optimum sıcaklığın tespiti için 10°C'lik artışlarla 10-100°C sıcaklık aralığında ölçümler yapıldı. Bölüm 3.2.5.'de anlatılan DNS enzim aktivite yöntemindeki 5 dk'lık ön ısıtma ve 20 dk'lık inkübasyon, 10-100°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilerek aktivite tayini yapıldı. Enzimin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen grafikte en yüksek aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık

değeri 100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar ona göre bağıl aktivite (%) cinsinden birbiriyle kıyaslandı.

#### **3.2.12.d. $\alpha$ -amilaz enzimi için stabil sıcaklığın belirlenmesi**

Enzimin sıcaklık stabilitesini belirlemek için; 70°C, 80°C, 90°C, 100°C sıcaklık değerlerinde enzim 30, 60, 90, 120 dk'lık inkübasyona tabi tutuldu. Bölüm 3.2.5'de anlatıldığı gibi aktivite tayini ile ölçümler yapıldı. Amilaz enzimi termal kararlılığını ifade eden grafik çiziminde her bir sıcaklık değerinde, inkübasyon öncesi  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi %100 kabul edilerek inkübasyon süreleri sonunda elde edilen değerler kalan aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edildi.

#### **3.2.12.e. $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi**

*B. licheniformis* SO7'den izole edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesine  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $K^+$  metal iyonlarının etkisi incelendi. Bunun için bu metal iyonlarının klorlu tuzları kullanılarak 100 mM'lık stok çözeltiden 1-10 mM'lık konsantrasyonlardaki çözeltiler enzim çözeltisi ile karıştırılarak 55°C'de 30 dk inkübe edildi ve bölüm 3.2.5'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Metal iyonu eklenmemiş enzimin aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve metal iyonu içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite değeri olarak buna göre hesaplandı.

#### **3.2.12.f. $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin belirlenmesi**

*B. licheniformis* SO7'den izole edilen amilaz enzimine bazı inhibitörlerin etkisini belirlemek amacı ile 5 mM EDTA, 10 mM PMSF, 10 mM  $\beta$ -merkaptotanol, 10 mM DNTB kullanıldı. EDTA,  $\beta$ -merkaptotanol, DNTB 50 mM pH 7,0 sodyum fosfat tamponunda, PMSF ise %96'lık etanol içerisinde hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler enzim çözeltisi ile 55°C'de 30 dk inkübe edilerek bölüm 3.2.5'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümü yapıldı. Herhangi bir inhibitör ajanı içermeyen enzimin aktivite değeri

%100 olarak kabul edildi ve inhibitör ajanı içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı.

#### **3.2.12.g. Bazı organik çözücülerin $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi**

SO7 amilaz enziminin organik çözücüler varlığında aktivitedeki değişimini incelemek için; DMSO, gliserol, etanol, metanol, aseton gibi organik çözücüler kullanıldı. Organik çözücüler %10 ve %30'luk konsantrasyonlarda ve pH 7,0 sodyum fosfat tamponu içerisinde hazırlandı. 500  $\mu$ l amilaz enzimi 500  $\mu$ l organik çözücü içeren tampon çözeltisi ile karıştırıldı. Karışım 55°C'de 30 dk inkübe edilerek bölüm 3.2.5'deki gibi aktivite tayini yapıldı. Herhangi bir organik çözücü içermeyen enzim aktivite değeri %100 olarak kabul edildi ve kalan aktivite değeri buna göre hesaplandı.

#### **3.2.12.h. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı yüzey aktif maddelerin etkisinin belirlenmesi**

%1 konsantrasyonda SDS, Tween-20, Tween-80, TritonX-100 kimyasalları varlığında SO7  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim incelendi. SO7 amilaz enzimi ile yüzey aktif madde 1:1 oranında (500  $\mu$ l enzim ve 500  $\mu$ l yüzey aktif madde) karıştırıldı ve 55°C'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bölüm 3.2.5'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümü gerçekleştirildi. 500  $\mu$ l enzim çözeltisine 500  $\mu$ l 50 mM pH 7,0 sodyum fosfat tamponu eklenerek aynı şartlarda inkübe edilen örneğin aktivitesi 100 olarak kabul edildi. Diğer örnekler için inkübasyon sonrası aktivite değeri kalan aktivite olarak değerlendirildi.

#### **3.2.12.i. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine $\text{CaCl}_2$ etkisinin belirlenmesi**

SO7  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine  $\text{CaCl}_2$  etkisinin incelenmesi amacıyla sodyum fosfat tamponu içerisinde 100 mM'lık  $\text{CaCl}_2$  stoğu hazırlandı. 0,01-0,1 mM 'lık  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyon aralığında her bir değer için ayrı ayrı sodyum fosfat tamponu ve substrat

çözeltisine  $\text{CaCl}_2$  eklendi. Bölüm 3.2.5’de ifade edildiği şekilde aktivite ölçümü gerçekleştirildi.  $\text{CaCl}_2$  içermeyen sodyum fosfat tamponu ve substrat çözeltisi ile gerçekleştirilen SO7  $\alpha$ -amilaz enzimi aktivite değeri 100 olarak kabul edildi. Elde edilen sonuçlar buna göre hesaplandı.

#### **3.2.12.i. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi için çeşitli substratların etkisinin belirlenmesi**

%2’lik konsantrasyonlarda SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin doğal substratlardaki aktivite değerinin belirlenmesi amacıyla substrat çözeltisi olarak patates, buğday, pirinç nişastalarının yanı sıra amiloz,  $\beta$ -siklodekstrin,  $\alpha$ -siklodekstrin, maltotrioz kullanılıp bölüm 3.2.5’de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Aktivite tayini sonucunda en yüksek değere sahip substrat aktivite değeri 100 olarak kabul edildi ve bağıl aktivite (%) olarak diğer değerler bu değere göre hesaplandı.

#### **3.2.12.j. $\alpha$ -amilaz enzimi için $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin hesaplanması**

SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerinin bulunması amacıyla %0,1-%2,5 aralığında artan konsantrasyonlarda substrat çözeltisi hazırlandı. Her bir konsantrasyon değeri için, hazırlanmış olan nişasta çözeltisinin 300  $\mu\text{l}$ ’si ile 500  $\mu\text{l}$  enzim çözeltisi karıştırıldı. Bölüm 3.2.5 anlatıldığı şekilde amilaz enziminin aktivite tayini yapıldı. Sonuçlara göre Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı (Laemmli, 1970).

#### **3.2.13. Verilerin istatistiksel analizi**

Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5 (Graphpad, La, Jolla, CA) Software 7,0 istatistiksel analiz programı kullanıldı. Bütün sonuçlar için  $\text{mean} \pm \text{standart hata}$  (SEM) değerleri analiz edildi.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. Seçilen İzolatların Klasik Yöntemlerle Tanımlanması

##### 4.1.1. Seçilen izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

İzolasyon çalışması sonucunda elde edilen test suşlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla bir dizi test gerçekleştirildi. Yapılan analizler sonucunda izolatların tamamının çubuksu hücre morfolojisine sahip, gram pozitif bakteriler olduğu tespit edildi. İzolatların üreyebildikleri optimum tuz konsantrasyonları, pH ve sıcaklık değerlerinin tespiti amacıyla gerçekleştirilen bir dizi analizler sonucunda sırasıyla; % 2-10, 3-9 ve 35- 85°C’de gelişebildikleri gözlemlendi (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** İzolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları

| Stok kodu | Gram | Morfoloji | Tuz konsantrasyon % | pH toleransı | Sıcaklık (°C) | Oksidaz | Katalaz |
|-----------|------|-----------|---------------------|--------------|---------------|---------|---------|
| SO1       | +    | Çubuk     | 2-10                | 3-9          | 35-85         | +       | +       |
| SO2       | +    | Çubuk     | 2-10                | 3-9          | 35-85         | +       | +       |
| SO3       | +    | Çubuk     | 2-10                | 3-9          | 35-85         | +       | +       |
| SO4       | +    | Çubuk     | 2-10                | 3-9          | 35-85         | +       | +       |
| SO5       | +    | Çubuk     | 2-10                | 3-9          | 35-85         | +       | +       |
| SO6       | +    | Çubuk     | 2-10                | 3-9          | 35-85         | +       | +       |
| SO7       | +    | Çubuk     | 2-10                | 3-9          | 35-85         | +       | +       |
| SO8       | +    | Çubuk     | 2-10                | 3-9          | 35-85         | +       | +       |
| SO9       | +    | Çubuk     | 2-10                | 3-9          | 35-85         | +       | +       |
| SO10      | +    | Çubuk     | 2-10                | 3-9          | 35-85         | +       | +       |
| SO15      | +    | Çubuk     | 2-10                | 3-9          | 35-85         | +       | +       |

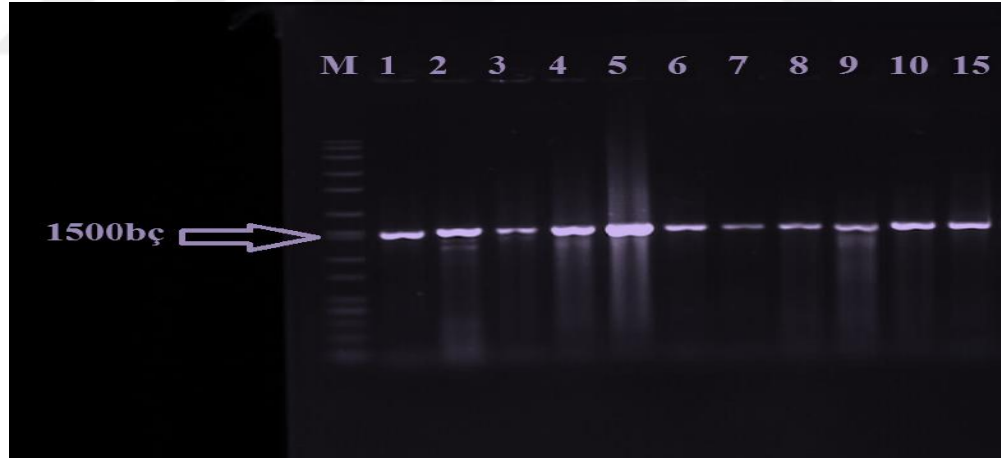
## 4.2. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

### 4.2.1. Genomik DNA izolasyonu

İzole edilen bakterilerin moleküler tanımlarının yapılabilmesi için öncelikle genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve DNA fragmentleri agaroz jelde yürütülerek, jel dökümantasyon sisteminde görüntülendi.

### 4.2.2. 16S rRNA PCR işlemi

16S rRNA gen bölgesi, 27F ve 1492R primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntüleme sisteminde analiz edildi ve tüm izolatların 1500 bp büyüklüğünde tek bant içerdiği gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 16S rRNA PCR jel görüntüsü

### 4.2.3. Amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

16S rRNA gen bölgesi amplifiye edildikten sonra uygun vektör sistemi kullanılarak ilgili gen klonlandı. Bunun için öncelikle ligasyon işlemi gerçekleştirildi ve sonrasında transformasyon ile devam edildi. Rekombinant ürünleri taşıdığı düşünülen *E.coli* izolatları amfisilin, X-gal ve IPTG içeren petrilere yayıldı ve 37°C'de 1 gece

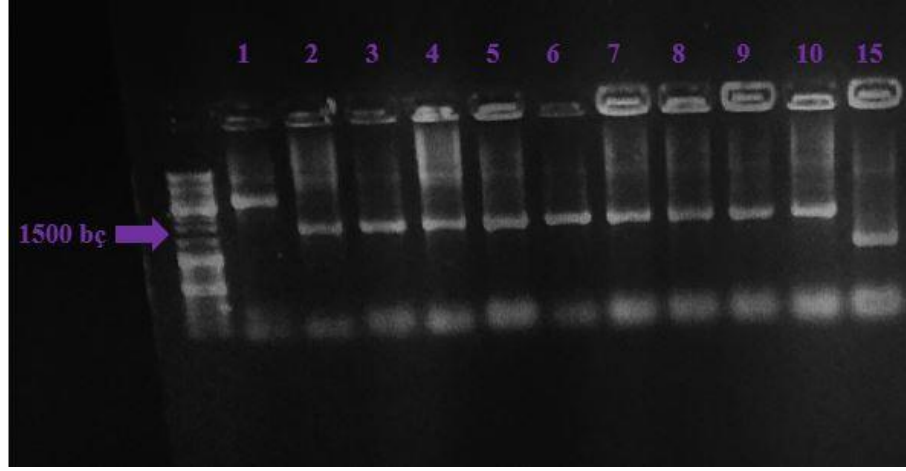
inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından mavi-beyaz tarama işlemi gerçekleştirildi. Mavi beyaz tarama sonucunda geni içeren beyaz koloniler titizlikle incelendi (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Mavi beyaz koloni tarama

#### **4.2.4. Koloni PCR**

İstenilen gen bölgesini ihtiva eden en uygun koloninin seçimi için koloni PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jel dökümantasyon sisteminde analiz edildi (Şekil 4.3). 1500 bp'de bant veren koloniler seçilerek işleme devam edildi.



**Şekil 4.3.** Koloni PCR örnek jel görüntüsü

#### 4.2.5. Plazmit izolasyonu

Agaroz jelde, 1500 bp'de tek bant veren koloniler seçilerek plazmit izolasyon aşamasına geçildi. İlgili koloniler petriden alınarak amfisilinli LB Broth'a aktarıldı ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında Promega firmasına ait izolasyon kiti (A1330) kullanılarak, plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmitin istenilen gen bölgesini taşıyıp taşımadığı EcoR I kesim enzimi kullanılarak incelendi. Pozitif sonuç veren ve en uygun konsantrasyona sahip olan örnekler MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi.

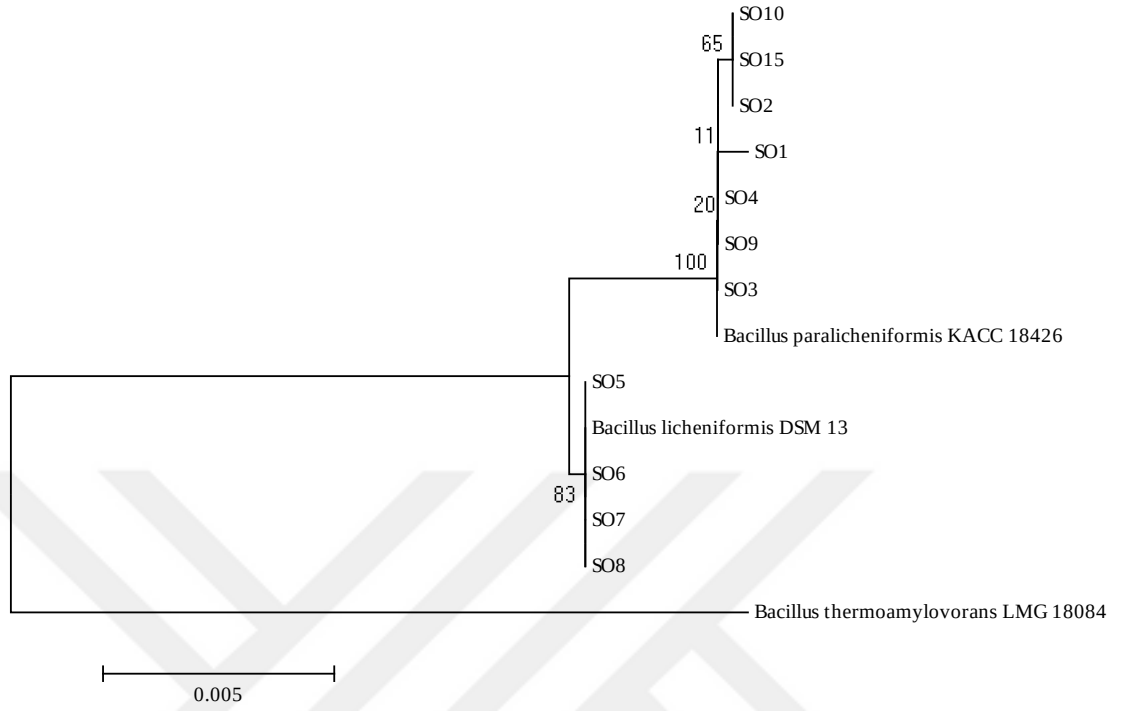
#### 4.2.6. DNA dizi analiz sonuçları

MacroGen firmasından alınan 16S rRNA sekans dataları anlamlı hale getirildikten sonra, elde ki veriler hem GenBank hem de Eztaxon'daki diziler ile karşılaştırıldı ve Genbank numaraları alındı. DNA dizi analizi sonuçları Çizelge 4.2'de verildi.

**Çizelge 4.2.** DNA dizi analizi sonucu belirlenen bakterilerin benzerlik yüzdeleri ve genbank numaraları

| İzolat Kodu | İzolat İsmi                       | Benzerlik Oranı | Genbank Numaraları |
|-------------|-----------------------------------|-----------------|--------------------|
| SO1         | <i>Bacillus paralicheniformis</i> | %99             | MG076971           |
| SO2         | <i>Bacillus paralicheniformis</i> | %99             | MG076972           |
| SO3         | <i>Bacillus paralicheniformis</i> | %99             | MG076973           |
| SO4         | <i>Bacillus paralicheniformis</i> | %99             | MG076974           |
| SO5         | <i>Bacillus licheniformis</i>     | %99             | MG076975           |
| SO6         | <i>Bacillus licheniformis</i>     | %99             | MG076976           |
| SO7         | <i>Bacillus licheniformis</i>     | %99             | MG076977           |
| SO8         | <i>Bacillus licheniformis</i>     | %99             | MG076978           |
| SO9         | <i>Bacillus paralicheniformis</i> | %99             | MG076979           |
| SO10        | <i>Bacillus paralicheniformis</i> | %99             | MG076980           |
| SO15        | <i>Bacillus paralicheniformis</i> | %99             | MG076981           |

Daha sonra elde edilen veriler kullanılarak çalışılan izolatlar arasındaki filogenetik ilişkinin ortaya konması amacıyla NJ (Neighbor-joining ; Komşu katılım bağlama) yöntemiyle bir filogenetik ağaç çizildi (Şekil 4.4).

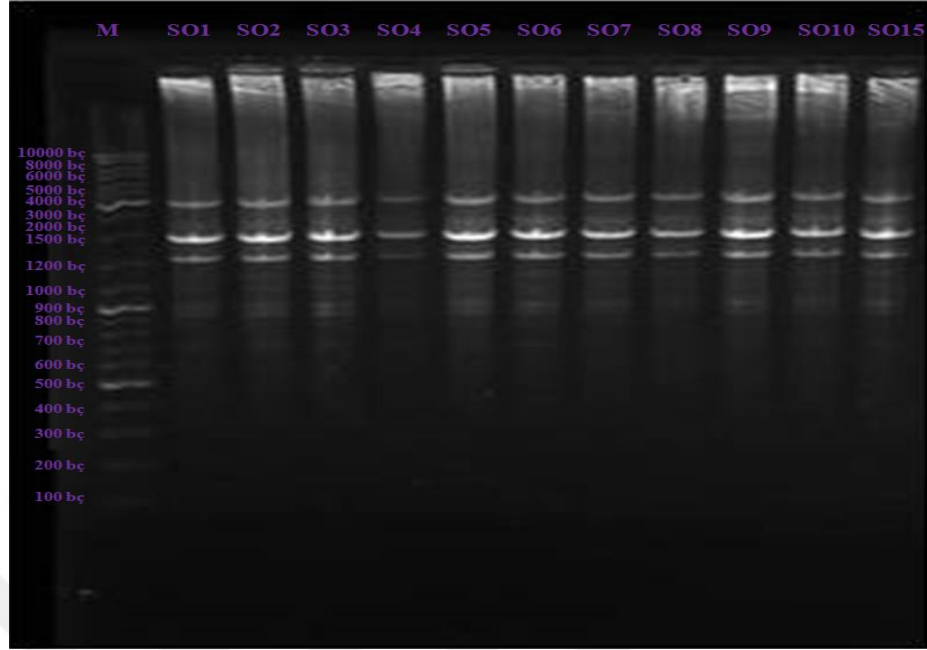


**Şekil 4.4.** Nevşehir Kozaklı termal kaplıca su örneğinden izole edilen suşların 16S rRNA gen analiz sonuçları esas alınarak oluşturulan Neighbor-joining filogenetik ağacı. *Bacillus thermoamylovorans* dış grup olarak kullanılmıştır.

### 4.3. rep-PCR Yöntemiyle Bakterilerin Gen Profillerinin Belirlenmesi

#### 4.3.1. BOX-PCR

BOX-PCR, bir genomik parmak izi analiz yöntemidir. Bu metod kullanılarak yapılan analiz sonucunda elde edilen bant profilleri incelendiğinde, izolatların 700-3000 bp arasında değişen 9 polimorfik bant içerdiği, BOX PCR yönteminin *Bacillus licheniformis* ve *B. paralicheniformis* izolatlarının ayırımında yeterli olmadığı belirlendi (Şekil 4.5).



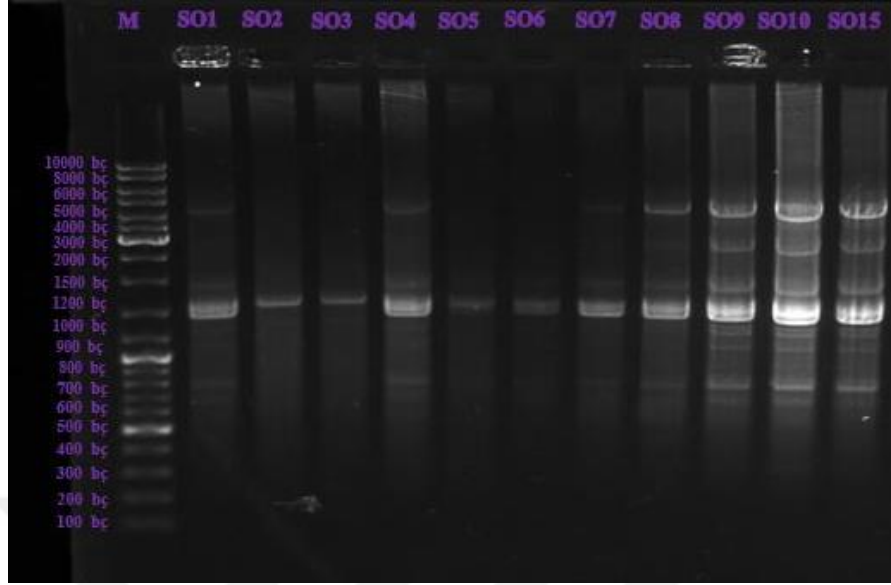
**Şekil 4.5.** Örneklerle ait BOX-PCR jel görüntüsü

[M: Marker (N0550S- Biolabs), sırasıyla 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 800, 900, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç].

#### 4.3.2. (GTG)<sub>5</sub>-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

Mikroorganizmalar arasında tür ve tür altı seviyede ki farklılıkları ortaya koymada rep-PCR yöntemi sıklıkla kullanılmakta olup, bu yöntemlerden biri de (GTG)<sub>5</sub>-PCR'dır. Bu PCR yöntemi kullanılarak yapılan analizler sonucunda 600-5500 bç arasında değişen 4-12 bant içerdiği izolatlar arasında ki ayırımı ortaya koymada bu PCR çeşidinin BOX-PCR'a göre daha etkili olduğu gözlemlendi.

PCR reaksiyonu sonucunda test izolatlarının; aynı bantlara sahip olduğu görüldü. Sonuçlar dikkate alındığında (GTG)<sub>5</sub>-PCR ve BOX-PCR yönteminin suşlar arasındaki genomik ayırma birbirlerini destekleyecek şekilde jel görüntüleri elde edildi (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** Bazı örneklere ait (GTG)<sub>5</sub>-PCR jel görüntüsü

[M: Marker (N0550S- Biolabs), sırasıyla 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 800, 900, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç].

#### 4.4. Katı Besiyerinde Ekstraselüler Amilaz Sentezleyen Bakterilerin Seçimi

Bunun için besiyerlerine lugol solüsyonu dökülerek koloniler etrafında şeffaf zonların oluşup oluşmadığı incelendi. Saflaştırılan 12 bakteriden 3'ünün lügol pozitif verdiği görüldü (Şekil 4.7). Daha sonra bu bakteri kültürlerinden en yüksek amilaz aktivitesine sahip olanı seçilerek çalışmalara devam edildi.



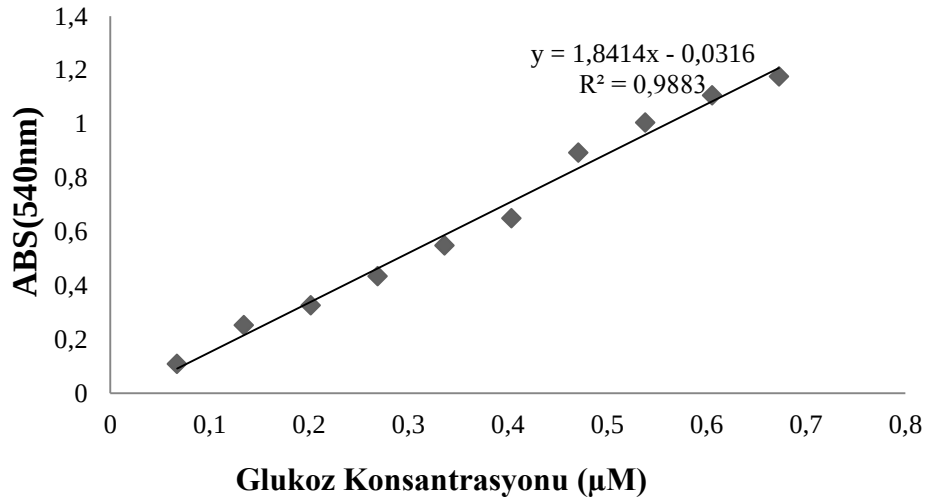
**Şekil 4.7.** *B. licheniformis* SO7 suşunun amilolitik petri testi görüntüsü

#### 4.5. Amilaz Aktivitesinin Tayini

Katı besiyerinde en yüksek amilaz aktivitesine sahip petri seçildikten sonra nişasta içerikli sıvı besiyerine ekim yapıldı. 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde aktivite ölçümü bölüm 3.2.5’de anlatıldığı şekilde DNS metoduyla gerçekleştirildi. *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enzimi 96. saatte maksimum aktivite gösterdi ve enzim çalışmaları için kullanıldı.

#### 4.6. Glukoz Standart Grafiğinin Oluşturulması

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan glukoz standart grafiği bölüm 3.2.6’da anlatıldığı şekilde 0,673 mg/mL konsantrasyonda stok glukoz çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Elde edilen sonuçlara göre konsantrasyona karşı absorbands grafiği çizildi (Şekil 4.8).

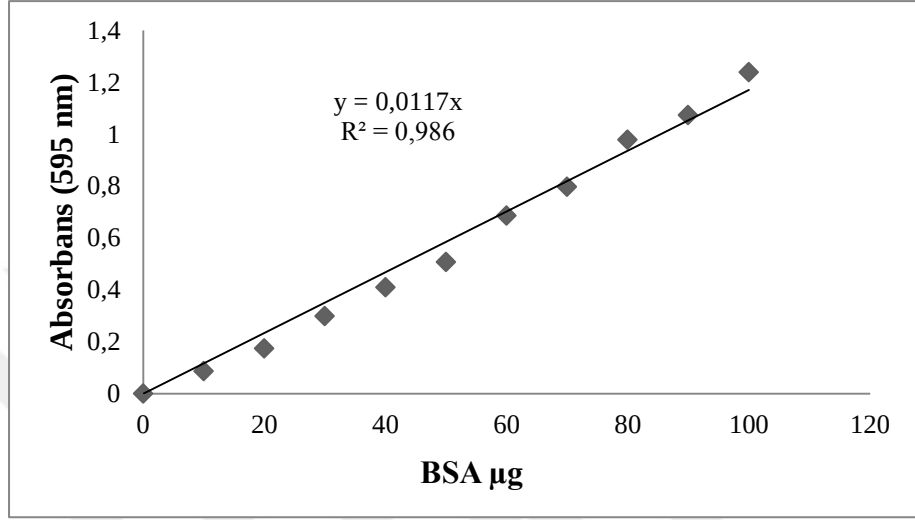


Şekil 4.8. Glukoz standart grafiği

#### 4.7. Protein Tayini

Protein tayini için kullanılan standart grafik elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bunun için; bölüm 3.2.7’de anlatıldığı

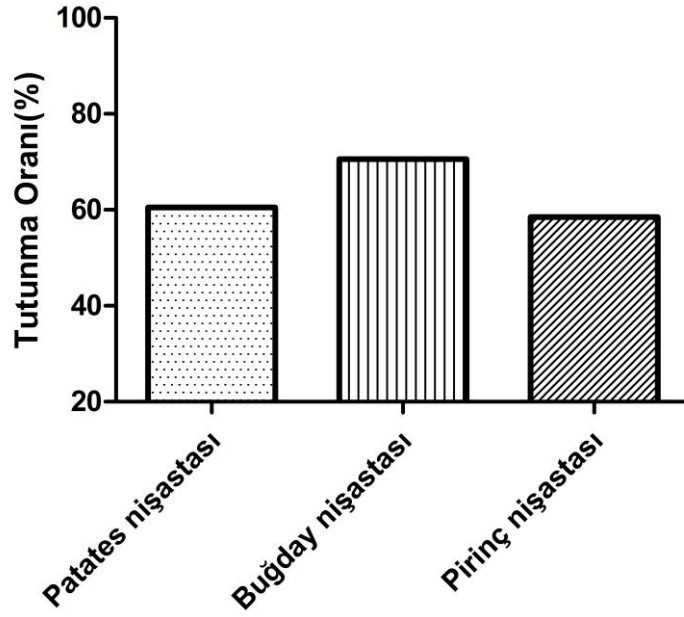
şekilde standart grafik hazırlandı. Ham homojenat ve saflaştırma sonrası elde edilen enzim çözeltilerindeki protein miktarı Şekil 4.9’da verilen standart grafikten yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 4.9. Protein standart grafiği

#### 4.8. Amilaz Enziminin Farklı Ham Nişastalara Tutunma Yeteneğinin Araştırılması

$\alpha$ -amilaz enziminin farklı nişasta kaynaklarına adsorpsiyon oranının belirlenmesi amacıyla bölüm 3.2.9’da anlatıldığı şekilde homojenat ve %1’lik pirinç, buğday ve patates nişastaları buzda 30 dk hafifçe karıştırılarak inkübe edildi. Aktivite ölçümleri sonucunda enzimin ham buğday, patates ve pirinç nişastalarına sırası ile %70,56, %60,51 ve %58,47 oranında tutunduğu belirlendi (Şekil 4.10). Elde edilen sonuca göre enzim saflaştırma çalışmalarında buğday nişastası kullanıldı.



**Şekil 4.10.** Amilaz enziminin farklı nişastalara tutunma yüzdesi

#### 4.9. Amilaz Enziminin Saflaştırılması

*B.licheniformis* SO7 enzimi nişasta afinite yöntemi ile 1,95 kat %28,65 verimle saflaştırıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3’de verildi.

**Çizelge 4.3.** *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin saflaştırılması

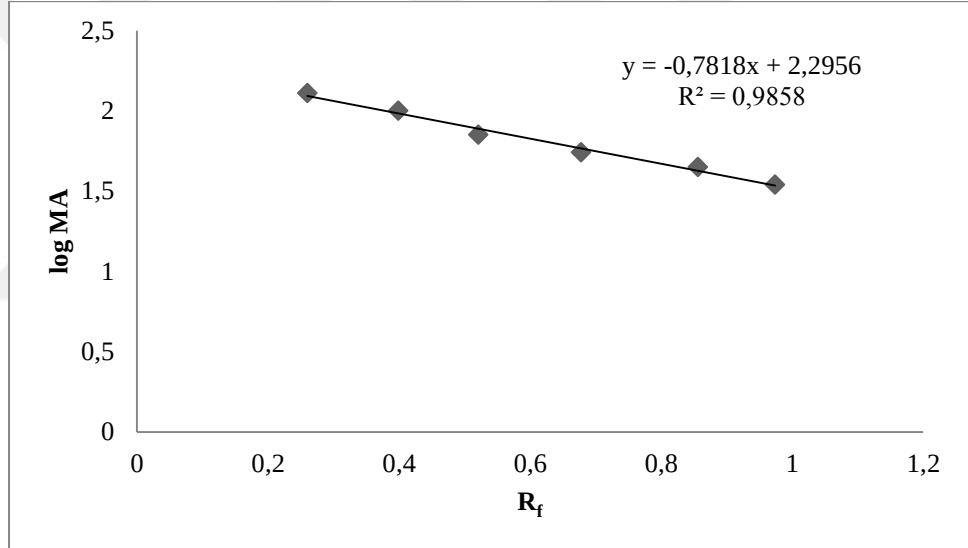
| Saflaştırma Basamakları | Total Hacim(mL) | Aktivite (U/mL) | Protein (mg/mL) | Toplam Aktivite (U/mL) | Toplam Protein (mg/mL) | Spesifik Aktivite (U/mg) | %Verim | Saflaştırma Katsayısı |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------|-----------------------|
| Homojenat               | 100             | 124,71          | 64,1            | 12471                  | 6410                   | 1,95                     | 100    | 1                     |
| Nişasta Afinite         | 48              | 74,46           | 19,65           | 3574,08                | 943,2                  | 3,78                     | 28,65  | 1,95                  |

#### 4.10. SDS-PAGE ve Zimogram Analizi

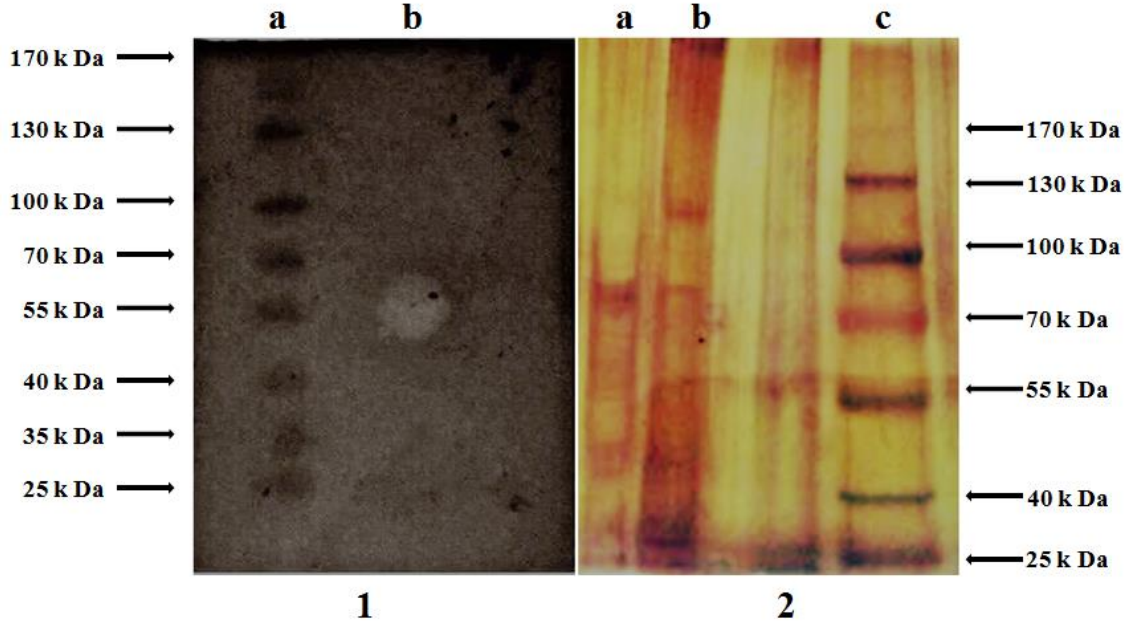
Saflaştırma sonucu elde edilen enzimin saflığının kontrolü ve molekül ağırlığının tayini için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı ve bölüm 3.2.11’de anlatıldığı şekilde elektroforez

yapıldı. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.12.'de gösterildi. SDS-PAGE sonrası elde edilen jel üzerinde enzimin ve standart protein markerlarının yürüdüğü mesafe ölçülerek  $R_f$  değeri hesaplandı. Log MA- $R_f$  değerleri ile çizilen Şekil 4.11. görülen grafikten yararlanılarak  $\alpha$ -amilaz enzimi molekül ağırlığı yaklaşık olarak 83,17 kDa olarak hesaplandı.

Amilaz enzimi SDS-PAGE sisteminde yürütülerek bölüm 3.1.10'da anlatıldığı şekilde zimogram analizi yapıldı. Jelde açığa çıkan beyaz bölge amilazın varlığını ve nişasta üzerindeki aktivitesini göstermektedir (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** SDS-PAGE sonucu çizilen log MA- $R_f$  grafiği



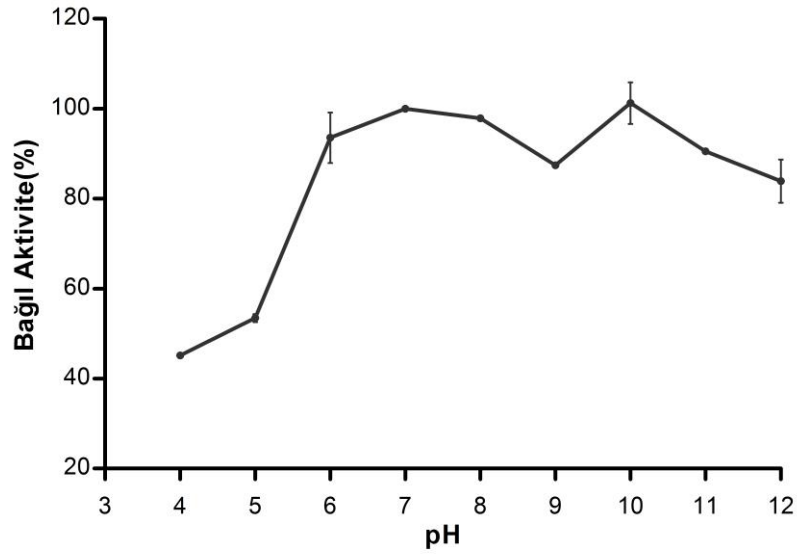
**Şekil 4.12.** SDS-PAGE ve zimogram analiz görüntüsü

\*1) Zimogram görüntüsü. a) protein marker b)  $\alpha$ -amilaz enzimi 2) SDS-PAGE jel görüntüsü. a) nişasta afinite metoduyla saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi b) homojenat c) protein marker.

#### 4.11. *B. licheniformis* $\alpha$ -Amilaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

##### 4.11.1. $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum pH değeri ve aralığının belirlenmesi

Amilaz enzimi optimum pH'sının belirlenmesi için (pH 4,0-12,0) değerlerinde hazırlanan tampon çözeltiler ile bölüm 3.2.5'deki yönteme göre amilaz enzim aktivitesi ölçüldü. Amilaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sodyum fosfat tamponu pH 7,0 optimum pH olarak belirlendi. Aynı zamanda asidik pH aralıklarında da aktivite gösterdiği gözlemlendi. Enzimin alkali pH'da bağıl aktivitesinin %90'nın üzerinde olduğu görülürken pH 4,0'de bağıl aktivitenin %46'ya düştüğü tespit edildi (Şekil 4.13).

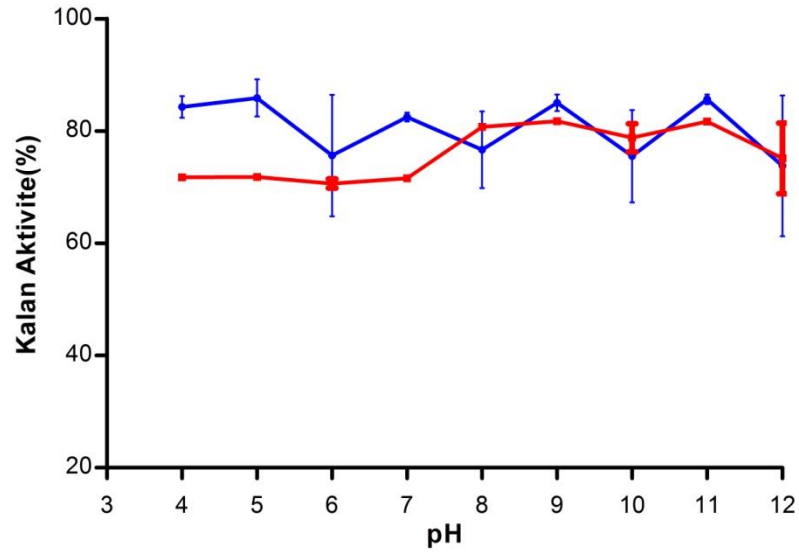


**Şekil 4.13.** *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH grafiği

\*Hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.

#### 4.11.2. $\alpha$ -amilaz enziminin pH kararlılığının belirlenmesi

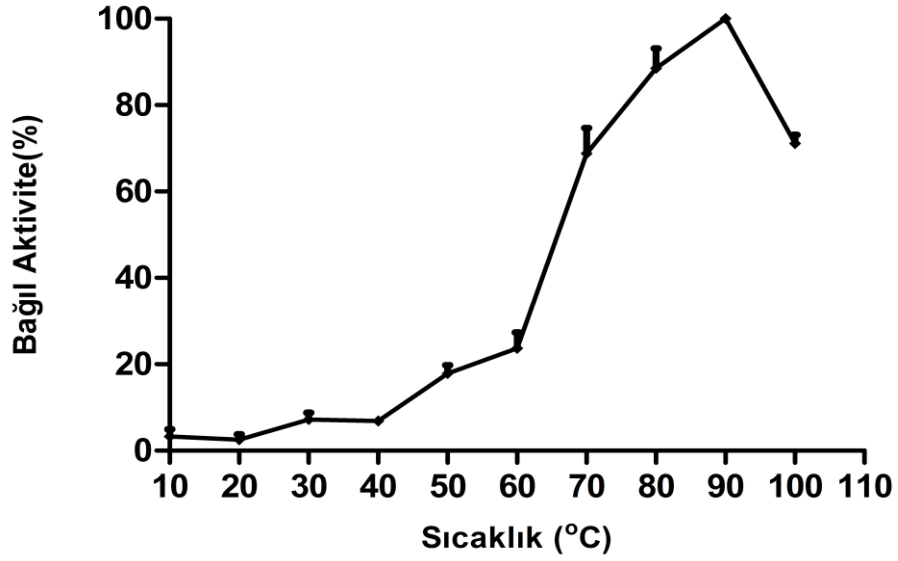
$\alpha$ -amilaz enziminin pH kararlılığının belirlenebilmesi amacıyla bölüm 3.2.12.b’de ifade edildiği gibi enzim ve farklı pH (4,0-12,0) aralıklarında tampon çözeltiler 1:1 oranında 55°C’de 1 saat, 4°C’de 24 saat inkübe edilerek süre sonunda DNS metodu ile aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Enzimin 4°C’de aktivitesini pH 8,0’de % 87 düzeyinde, pH 9,0-12,0 aralığında ise aktivitesini ortalama %85 oranında koruduğu belirlendi. 55°C’deki inkübasyon sonrasında enzim aktivitesinde bazı pH değerlerinde düşüş gözlemlendi. Enzimin en düşük kalan aktivite yüzdesi pH 6,0’de %67 olarak tespit edildi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda enzimin geniş bir pH aralığında stabil kalabildiği belirlendi. Elde edilen veriler Şekil 4.14’de gösterildi.



**Şekil 4.14.** 4°C (■) ve 55°C (●)'de pH'nın  $\alpha$ -amilaz enzim kararlılığı üzerine etkisi  
 \*Hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.

#### 4.11.3. $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesi

SO7  $\alpha$ -amilaz enzimi için bölüm 3.2.12.c'deki yöntemle göre optimum sıcaklık değeri belirlendi. Enzimin sıcaklık profilini belirlemek amacıyla 10°C ile 100°C arasındaki sıcaklıklar denendi. Bunun sonucunda  $\alpha$ -amilaz enzimi optimum sıcaklık değeri 90°C olarak belirlendi. Enzimin düşük sıcaklıklarda az da olsa aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin artışıyla paralel olarak enzim aktivitesinin arttığı tespit edildi. 100°C'de amilaz enzim aktivitesinin düşmeye başladığı gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.15'de verildi.

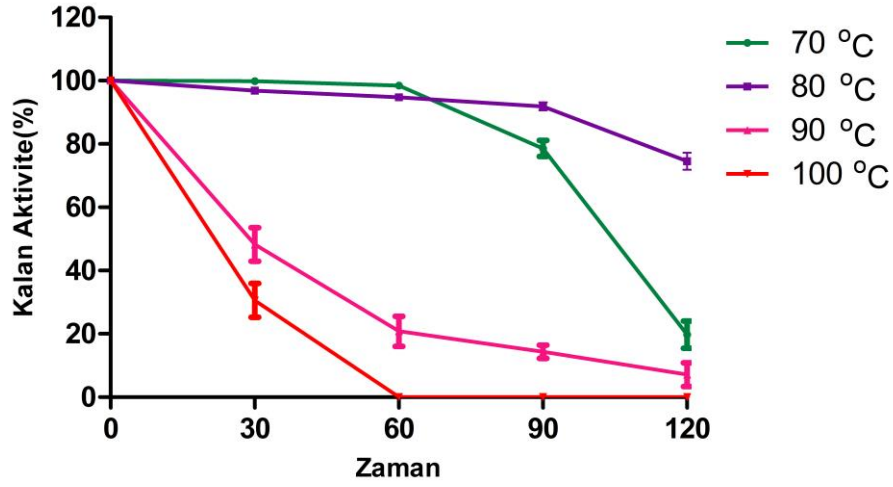


**Şekil 4.15.**  $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesi.

\*Hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.

#### 4.11.4. $\alpha$ -amilaz enzimi için stabil sıcaklığın belirlenmesi

*B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek amacıyla bölüm 3.2.12.d anlatıldığı gibi 70-100°C sıcaklık aralığında 30, 60, 90 ve 120 dk'lık inkübasyon sürelerinde aktivite ölçümü gerçekleştirildi. 100°C'de 30 dk sonunda enzim aktivitesinin hızlı bir şekilde kaybedildiği 60 dk sonunda enzimin aktivitesini kaybettiği belirlendi. 70°C'de 60. dk ya kadar %98 oranında enzim aktivitesini korurken 90 dk sonrasında düşüş gözlemlendi. 80°C'de 30, 60 ve 90 dk sonunda enzimin aktivitesini %90'nın üzerinde koruyarak oldukça önemli bir kararlılığa sahip olduğu belirlendi. 80°C'de 120 dk'lık inkübasyon süresinin sonunda ise enzimin aktivitesinin %21'ini kaybettiği tespit edildi (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** Sıcaklığın  $\alpha$ -amilaz enzim kararlılığı üzerine etkisi

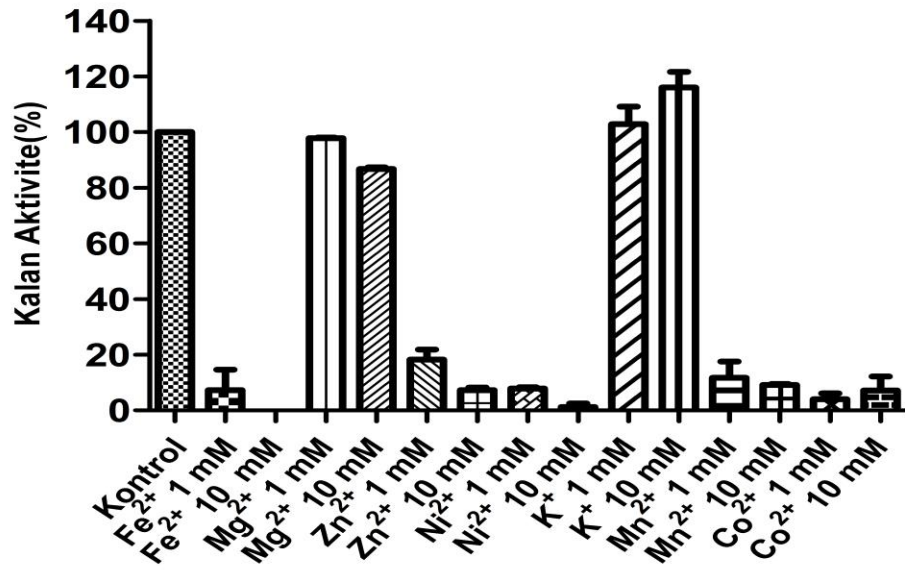
\*Hata çubukları standart hata değerlerini göstermektedir.

#### 4.11.5. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi

Metal iyonlarının  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla, 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $K^+$  metal iyonları kullanılarak bölüm 3.2.12.e'de belirtilen yöntemle göre amilaz aktivitesi belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4 ve Şekil 4.17'de verildi.  $Mg^{2+}$  iyonunun 1 mM konsantrasyonda enzim aktivitesinde önemli bir değişime neden olmadığı, 10 mM konsantrasyonda ise enzimin aktivitesinin %13,27'sini kaybettiği belirlendi.  $K^+$  iyonunun her iki konsantrasyon değerinde de  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesini arttırdığı görüldü.  $Fe^{2+}$  iyonu 1 mM konsantrasyonda aktiviteyi önemli ölçüde azaltırken 10 mM konsantrasyonda enzimi tamamen inhibe edici bir etki gösterdi.  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  metal iyonlarının konsantrasyon değeri arttıkça enzim üzerinde daha fazla (%7-%2) aktiviteyi azaltacak şekilde etki gösterdiği görüldü.

**Çizelge 4.4.** Bazı metal iyonlarının amilaz aktivitesi üzerine etkisi

| Metal İyonları         | 1 mM         | 10 mM      |
|------------------------|--------------|------------|
| <b>Kontrol</b>         | 100±0,00     | 100±0,00   |
| <b>Fe<sup>2+</sup></b> | 7,3±12,6     | 0          |
| <b>Mg<sup>2+</sup></b> | 97,84±0,3    | 86,73±1,11 |
| <b>Zn<sup>2+</sup></b> | 18,30±6,2    | 7,33±1,58  |
| <b>Ni<sup>2+</sup></b> | 7,89±0,79    | 1,22±2,12  |
| <b>K<sup>+</sup></b>   | 102,82±10,99 | 116,0±9,75 |
| <b>Mn<sup>2+</sup></b> | 11,68±10,2   | 9,10±0,70  |
| <b>Co<sup>2+</sup></b> | 7,12±3,67    | 4,03±8,84  |

**Şekil 4.17.** Bazı metal iyonlarının amilaz aktivitesi üzerine etkisi

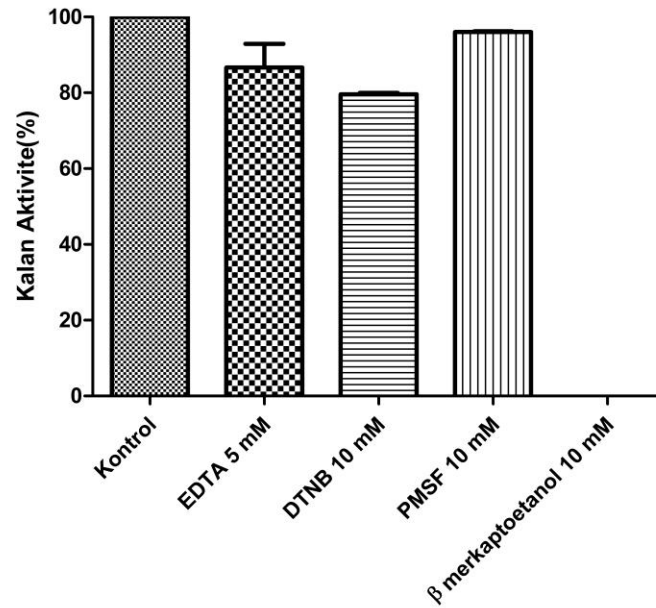
#### 4.11.6. Bazı inhibitörlerin amilaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

*B. licheniformis* SO7'dan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin üzerine inhibisyon ajanlarının etkisinin belirlenmesi amacıyla 5 mM EDTA, 10 mM'lık konsantrasyonlarda PMSF,  $\beta$ -merkaptotanol ve DTNB kullanıldı. Bölüm 3.2.12.f'de anlatılan yöntemle göre elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5 ve Şekil 4.18'de verildi. Bu sonuçlara göre, EDTA ve

PMSF enzim aktivitesini önemli düzeyde etkilemezken sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril oksidasyon ajanı olan DTNB aktiviteyi %20 oranında düşürdü. SH grubu (sülfidril grubu) inhibitörü olan  $\beta$ -merkaptetanölün ise amilaz enzimini tamamen inhibe ettiği görüldü.

**Çizelge 4.5.** *B.licheniformis* SO7'den elde edilen amilaz enzimi üzerine inhibisyon ajanlarının etkisi

| İnhibisyon Ajanları                          | Kalan Aktivite (%) |
|----------------------------------------------|--------------------|
| <b>Kontrol</b>                               | 100±0,00           |
| <b>EDTA 5Mm</b>                              | 86,62±10,83        |
| <b>DTNB 10Mm</b>                             | 79,58±0,64         |
| <b>PMSF 10mM</b>                             | 96,05±0,19         |
| <b><math>\beta</math>-merkaptetanöl 10mM</b> | 0                  |



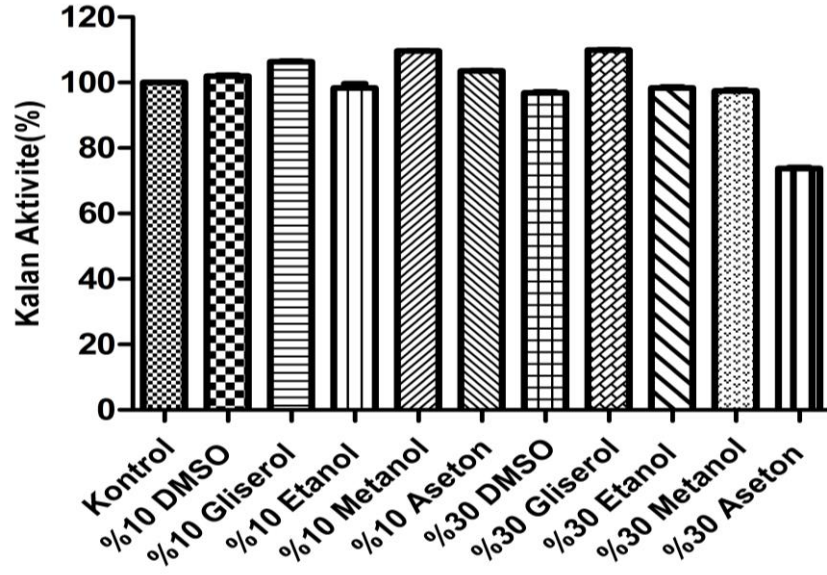
**Şekil 4.18.** *B.licheniformis* SO7'den elde edilen amilaz enzimi üzerine inhibisyon ajanlarının etkisi

#### 4.11.7. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı organik çözücülerin etkisi

DMSO, gliserol, etanol, metanol ve aseton gibi organik çözücülerin %10-%30'luk konsantrasyonlarda  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine etkisi bölüm 3.2.12.g'de anlatıldığı şekilde araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6 ve Şekil 4.19'da verildi. %10'luk konsantrasyonda DMSO'nun enzim aktivitesini arttırdığı %30'luk konsantrasyonda ise önemli düzeyde olmamakla beraber aktiviteyi azalttığı gözlemlendi. Her iki konsantrasyon değerinde de gliserolün aktiviteyi arttırıcı bir etkiye sahip olduğu belirlenirken etanolün ise enzimin kararlılığını koruduğu tespit edildi. Metanol ve asetonun %10'luk konsantrasyon değerlerinde enzimin aktivitesini arttırdığı %30'luk aseton konsantrasyonunda ise aktivitesini %27 oranında kaybettiği gözlemlendi.

**Çizelge 4.6.** Bazı organik çözücülerin amilaz aktivitesi üzerine etkisi.

| Organik Çözücüler | Kalan Aktivite (%) |
|-------------------|--------------------|
| Kontrol           | 100±0,00           |
| %10 DMSO          | 101,95±0,52        |
| %30 DMSO          | 96,88±0,46         |
| %10 Gliserol      | 106,35±0,41        |
| %30 Gliserol      | 109,98±0,19        |
| %10 Etanol        | 98,33±2,32         |
| %30 Etanol        | 98,35±0,44         |
| %10 Metanol       | 109,60±0,16        |
| %30 Metanol       | 97,44±0,59         |
| %10 Aseton        | 103,58±0,16        |
| %30 Aseton        | 73,72±0,52         |



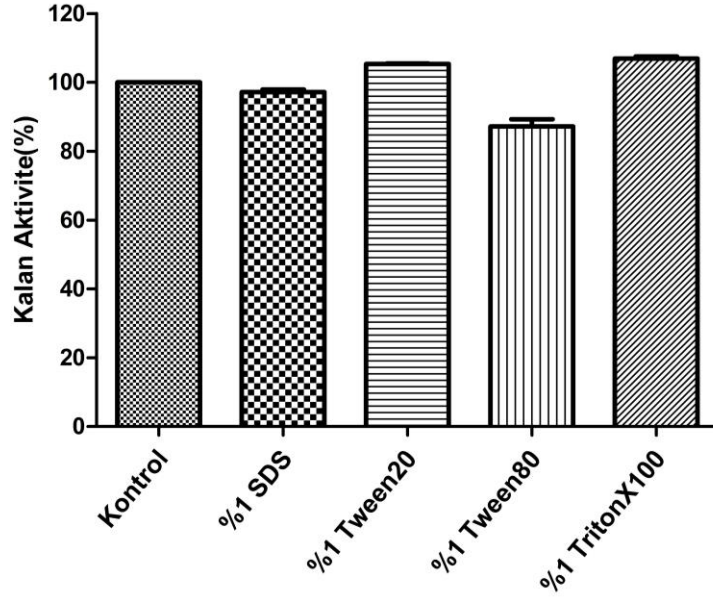
**Şekil 4.19.** Bazı organik çözücülerin amilaz aktivitesi üzerine etkisi

#### 4.11.8. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine bazı yüzey aktif maddelerin etkisi

SO7  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine bazı yüzey aktif maddelerin etkisinin belirlenmesi amacıyla %1'lik konsantrasyonlarda SDS, Tween-20, Tween-80, Triton-X-100 kullanılarak bölüm 3.2.12.h'da belirtilen yöntemle göre elde edilen deney sonuçları Çizelge 4.7 ve Şekil 4.20.'de verildi. Tween-20 ve Triton-X-100'ün enzim aktivitesini %5-%6 oranında arttırdığı belirlendi. SDS ve Tween-80'in ise enzim aktivitesini %3-%13 oranında azalttığı tespit edildi.

**Çizelge 4.7.** Deterjanların  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine etkisi

| Deterjan               | Kalan Aktivite (%) |
|------------------------|--------------------|
| <b>Kontrol</b>         | 100±0,00           |
| <b>%1 SDS</b>          | 97,19±0,71         |
| <b>%1 Tween-20</b>     | 105,36±0,12        |
| <b>%1 Tween-80</b>     | 87,19±2,12         |
| <b>%1 Triton-X-100</b> | 106,89±0,62        |



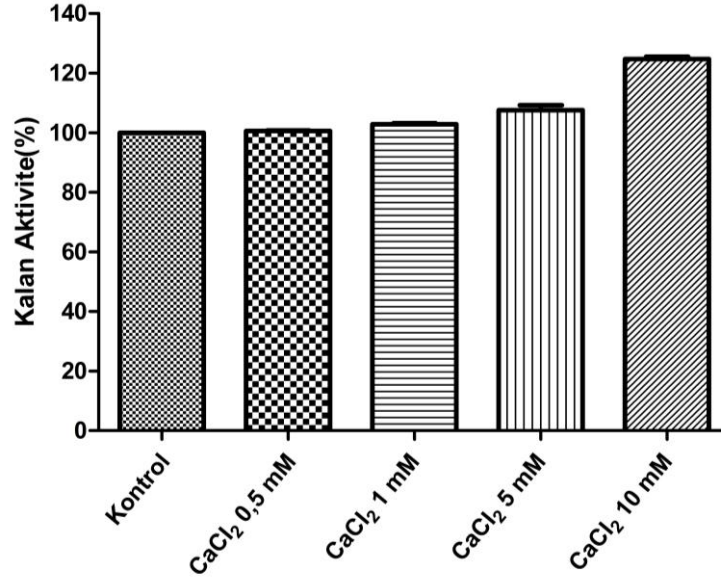
**Şekil 4.20.** Deterjanların  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine etkisi

#### 4.11.9. $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi üzerine $\text{CaCl}_2$ etkisi

Enzim aktivitesi üzerine kalsiyum klorürün etkisinin belirlenmesi amacıyla bölüm 3.2.12.1’de ifade edildiği şekilde 100 mM stok  $\text{CaCl}_2$  çözeltisinden final konsantrasyonu 0,5, 1, 5, 10 mM olacak şekilde reaksiyon karışımına eklendi. Standart koşullarda aktivite ölçümü gerçekleştirildi.  $\text{CaCl}_2$  içermeyen enzim çözeltisinin aktivite miktarı %100 olarak kabul edildi. Elde edilen sonuçlara göre artan  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyonuna bağlı olarak  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesinin de arttığı belirlendi. (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.21.).

**Çizelge 4.8.**  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine  $\text{CaCl}_2$  etkisi.

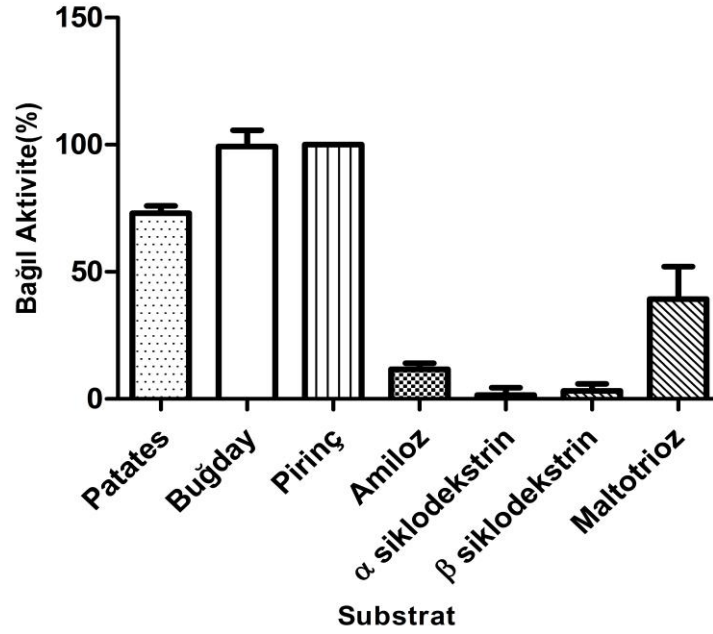
| $\text{CaCl}_2$ Konsantrasyonu | Amilaz Aktivitesi (%) |
|--------------------------------|-----------------------|
| <b>Kontrol</b>                 | 100±0,00              |
| <b>0,5Mm</b>                   | 100,57±0,19           |
| <b>1Mm</b>                     | 102,84±0,37           |
| <b>5Mm</b>                     | 107,58±1,68           |
| <b>10Mm</b>                    | 124,72±0,75           |



**Şekil 4.21.**  $\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine  $\text{CaCl}_2$  etkisi

#### 4.11.10. $\alpha$ -amilaz enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi

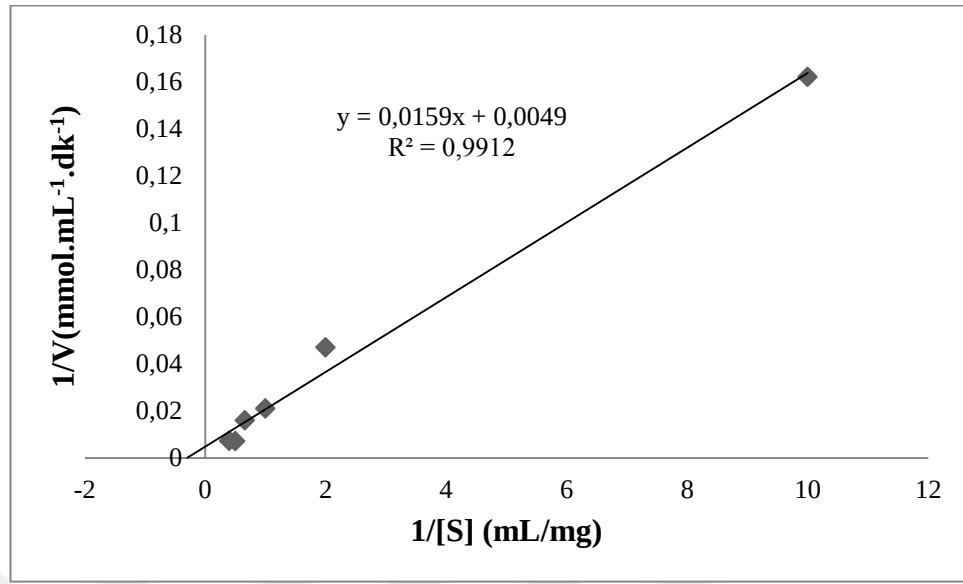
*B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin %2'lik konsantrasyonlarda çeşitli substratlara karşı ilgisi belirlendi. Bölüm 3.2.12.i'de anlatılan yöntemle göre en yüksek aktivitenin görüldüğü pirinç nişastası %100 kabul edildi. Amilaz enziminin pirinç nişastasından sonra buğday ve patates nişastalarına (%99-%73) diğer substratlara göre daha yüksek bir ilgi gösterdiği görüldü. Enzimin maltotrioza karşı %39 ilgi gösterdiği, halkasal glukoz ünitelerinden oluşan  $\alpha$ -siklodekstrin ve  $\beta$ -siklodekstrini ise az da olsa substrat olarak kullanılabildiği belirlendi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22.  $\alpha$ -amilaz enziminin substrat spesifitesi

#### 4.11.11. $\alpha$ -amilaz enziminin $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin hesaplanması

$\alpha$ -amilaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla 0,1-2,5 mM çözünür pirinç nişastası konsantrasyonlarında  $\alpha$ -amilaz enziminin kinetik çalışması gerçekleştirildi. Enzimin maksimum hızını ( $V_{max}$ ) ve Michaelis-Menten sabitini ( $K_m$ ) saptamak için, bölüm 3.2.12.j’de belirtilen yöntemle göre  $1/V$ ’ye karşı  $1/[S]$  Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilazın çözünür nişasta substratı için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 3,24 mg/mL ve 204,08 mmol.mL<sup>-1</sup>.dk<sup>-1</sup> olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.23’de gösterildi.



Şekil 4.23. *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilazı için Lineweaver-Burk grafiği

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya endüstriyel enzim pazarının yıllık 2,7 milyar dolar olduğu ve 2012’de yıllık %4 artış gösterdiği bilinmektedir. Deterjan (%37), tekstil (%12), nişasta (%11), fırıncılık (%8) ve havyan yemi üretimi (%6) enzimlerin kullanıldığı temel endüstriyel alanlardır (Schallmey *et al.* 2004; Das *et al.* 2011; Öztürk 2013).  $\alpha$ -amilaz enzimi en önemli endüstriyel enzimler arasında yer almakta ve pazarın yaklaşık %25-30’unu oluşturmaktadır (Rajagopalan and Krishnan 2008; Azad *et al.* 2009; Deb *et al.* 2013).  $\alpha$ -amilaz enziminin endüstriyel pazardaki yeri ve dünya üzerindeki pek çok ülkede dışa bağımlılığın olması biyoteknoloji çalışmalarında bu enzimi daha da değerli hale getirmiştir. Gıdadan deterjan endüstrisine, kağıt endüstrisinden ilaç endüstrisine kadar pek çok alanda  $\alpha$ -amilaz enzimini görmek mümkündür. Bu sebeplerden dolayı ticari ve ekonomik değeri olan amilaz enzimini izole etmek, saflaştırmak ve karakterize etmek günümüzde oldukça önem kazanmıştır.

Enzimlerin endüstriyel alanda kullanımlarındaki temel hedef en düşük maliyetle en yüksek verimi alabilmektir. Mikroorganizmalar kolay kültüre edilmeleri ve kısa sürede yüksek verim sağlamalarıyla enzim çalışmaları için önemli bir kaynak haline gelmiştir. Endüstriyel çalışmalarda daha çok ekstrem koşullara dayanıklı mikroorganizmalar ve enzimler tercih edilmektedir. Bu amaçla mikroorganizmaların biyoteknolojide uygulanabilirliği konusunda, onları izole ederek karakterize etmek oldukça önemlidir (Sen *et al.* 2014).

Bu tez çalışması kapsamında; ilk olarak Nevşehir-Kozaklı kaplıcalarından alınan su örneklerinden izole edilen toplam 11 bakteriyel izolatın fenotipik ve genotipik karakterizasyonu gerçekleştirildi. 16S rRNA sekans analizi sonucunda; SO1, SO2, SO3, SO4, SO9, SO10 ve SO15 izolatlarının *B. paralicheniformis*’e; SO5, SO6, SO7, SO8’in ise %99 oranında *B. licheniformis*’e benzerlik gösterdiği belirlendi. Daha sonra tüm izolatlar için amilaz ön enzim aktiviteleri, nişasta içeren petrilerde incelendi ve SO7 izolatının en büyük zonu verdiği gözlemlendi. Çalışmanın ikinci aşamasında ise *B. licheniformis* SO7 suşundan  $\alpha$ -amilaz enzimi saflaştırıldı ve karakterize edildi.

Karbohidratazların en önemli kaynağını *Bacillus* cinsindeki organizmalar oluşturmakta ve *Bacillus* türleri toprakta, suda, ve çeşitli gıdalarda bulunabilmektedir. Yapılan literatür çalışması sonucunda endüstriyel alanda sıkça kullanılan amilaz üreticileri *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* (Souza *et al.* 2010) olarak tanımlanmıştır. Son yıllarda yüksek sıcaklıklardaki termal kararlılıkları nedeniyle *B.stearothermophilus* ve *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilaz enziminin tercih edildiği (Bertoldo and Antranikian 2002) bilinmektedir. Bu tez çalışması sonucunda elde edilen verilere göre literatürü destekler şekilde *B. licheniformis* SO7 suşundan elde edilen  $\alpha$ -amilaz enziminin de 80°C’de 120 dk sonunda aktivitesinin %79’unu koruyarak önemli bir kararlılığa sahip olduğu belirlendi.

Literatürde amilaz enziminin tipik olarak iki veya daha fazla kromatografik basamak kullanılarak saflaştırıldığı bildirilmiştir (Lim *et al.* 2003). Bu tez çalışması kapsamında,  $\alpha$ -amilazının saflaştırılması Metin *et al.* (2010) *Penicillium citrinum* HBF62 amilaz enzimi nişasta afinite kromatografisi ile 18 kat %82 verimle; Azad *et al.* (2009) kozalak çekirdeklerinden  $\alpha$ -amilaz enzimi; amonyum sülfatla çöktürme, DEAE anyon değişim kromatografisi ve nişasta afinite kromatografi yöntemleri kullanılarak 1286,1 kat saflaştırılmıştır. Najafi and Kembhavi (2005) tarafından uygulanan metodun küçük bir modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Nişasta afinite metodunun uygulanma amacının enzimi daha düşük maliyetle yüksek verimde saflaştırmak olduğu bildirilmiştir (Najafi and Kembhavi, 2005). *B.licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enzimi nişasta afinite metoduyla 1,95 kat %28,65 verimle saflaştırılmıştır. Kaneko *et al.* (2005) *Streptomyces* sp.  $\alpha$ -amilazının nişastaya tutunma yöntemi ile 32,7 kez; Najafi and Kembhavi (2005) *Vibrio* sp.  $\alpha$ -amilaz enziminin nişasta afinite yöntemi ile 163,5 kat %78 verimle; Mendu *et al.* (2005) *B. licheniformis* amilaz enziminin (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve nişasta afinite metoduyla 230 kat %51 verimle saflaştırılmış; Primarini and Ohta (2000) yapılan çalışmada *Streptomyces* sp. amilazı nişasta adsorpsiyon, afinite kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi ile 126 kat %2 verimle saflaştırıldığı rapor edilmiştir. Abou-Zeid, (1997) *Aspergillus flavus* amilaz enzimini nişasta afinite, aseton çökmüşürmesi ile 262,32 kat %0,57 verimle saflaştırıldığı rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür ile

karşılaştırıldığında bazı çalışmalara göre amilaz enziminin daha yüksek verimle saflaştırıldığı görülmektedir.

Geniş çeşitlilikte mikrobiyal  $\alpha$ -amilaz olmasına rağmen molekül ağırlıklarının genellikle 10-120 kDa arasında (Gupta *et al.* 2003) olduğu belirtilmiştir. *B.licheniformis* SO7 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin SDS-PAGE analizi molekül ağırlığı yaklaşık 83,17 olarak kDa hesaplandı.  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin molekül ağırlıkları 10-210 kDa arasında değişkenlik gösterir (Baltaş 2012). Bilinen en küçük  $\alpha$ -amilaz *B. caldolyticus*'ta en büyüğü ise *Chloroflexus aurantiacus*'ta bulunmuştur (Baltaş 2012). Abou Dohara *et al.* (2011), yapmış oldukları çalışmada bazı soylarda molekül ağırlığının işleme ve proteoliz gibi işlemler sonucu değişebileceğini, *Thermoactinomyces vulgaris*'te glikolizasyon sonrası enzimin molekül ağırlığının 140 kDa olurken aynı türün farklı bir suşunda proteoliz sonucu daha küçük moleküllere ayrıldığını bildirmişlerdir. *Bacillus* sp. DM-15'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin molekül ağırlığı 126 kDa olarak bulmuşlardır (Ozcan *et al.* 2010). *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilazının saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi, nişasta afinite metodu kullanılmış ve saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 58 kDa olarak bulunmuştur (Mendu *et al.* 2005). Metin *et al.* (2010) çalışmasında enzimin molekül ağırlığı 65 kDa olarak belirlenmiştir. *B. subtilis*'te 54 kDa ve 57 kDa, *B. licheniformis*'te 58 kDa ve 64 kDa büyüklüğünde  $\alpha$ -amilazlar belirlenmiştir (Pandey *et al.* 2000). Elde ettiğimiz sonuca göre literatürde de bunların örnekleri mevcuttur. amy28  $\alpha$ -amilaz enziminin ~72 kDa büyüklüğünde olduğu (Lim *et al.* 2003), Abou-Zeid (1997) *Aspergillus flavus* amilaz enzim molekül ağırlığını 75 kDa olarak belirlemişlerdir. *B. licheniformis* SO7 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin molekül kütlesi bu sonuçlarla uyumludur.

*B. licheniformis* SO7'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi için literatürü destekler nitelikte optimum pH 7,0 olarak bulundu. Enzimin pH 6,0-12,0 arası yüksek aktivite gösterdiği ancak pH 4,0-5,0 arası aktivitesinin düştüğü belirlendi. Goyal *et al.* (2005) yapmış oldukları çalışmada *Bacillus* sp. I-3'den elde ettikleri  $\alpha$ -amilazın optimum pH'sını 7,0 olarak belirtmişlerdir. Literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında Primarini *et al.*

(2000) *Streptomyces* sp.'den elde edilen amilaz I ve amilaz II'nin için optimum pH'sını 5,5, Hmidet *et al.* (2008) *B. licheniformis* NH1'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH'sını 6,0 olduğu, Hmidet *et al.* (2010) *B. mojavensis* A21'den saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH'sını 6,5, Sidkey *et al.* (2010) *Aspergillus flavus* F2Mbb'den saflaştırılan ekstraselüler  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum pH'sını 6,4 olarak bildirmişlerdir.  $\alpha$ -amilaz enziminin nişastanın sıvılaştırılması işleminde kullanılması için pH'nın 6,0-6,5 arasında olması, deterjan endüstrisi için ise pH'nın 8,0-11,0 arasında olması gerekmektedir (Baltaş 2012). Elde edilen veriler SO7 enziminin birçok endüstriyel alanda kullanım olanağına sahip olabileceğini göstermektedir.

*B. licheniformis* SO7'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi için 4°C'de stabil pH 8,0-11,0 aralığı olarak belirlendi. Elde edilen enzimin aktivitesinin pH 8,0-11,0 arasında %80'den fazlasını koruduğu görüldü. 55°C'de ise enzim aktivitesinin pH 11,0'de %80'den fazlasını koruduğu belirlendi. Goyal *et al.* (2005) *Bacillus* sp. I-3 amilazının stabil pH'sını 5,0-5,5, Demirkan *et al.* (2005) *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amilazının stabil pH'sını 5,8-8,0, Ueda *et al.* (2008) *Eisenia foetida*  $\alpha$ -amilazının I ve II için stabil pH'sını sırasıyla 7,0-9,0, Liu ve Xu, (2008) *Bacillus* sp. YX-1  $\alpha$ -amilazının stabil pH'sını 4,5-11,0, Al-Quadani, (2009)'da *Bacillus* sp. HUTBS71  $\alpha$ -amilaz enziminin için stabil pH'sını aralığı 5,2-10,0 aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Çok yüksek ya da düşük pH değerleri enzimlerin hızlı bir biçimde denatüre olmalarına neden olmaktadır (Shah *et al.* 2014). pH'ya duyarlı olmayan enzimler ise endüstrideki kullanım kolaylıklarından dolayı tercih sebebidirler. Literatürdeki benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin oldukça iyi bir stabiliteye sahip olduğu görülmektedir.

*B. licheniformis* SO7'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi için optimum sıcaklık değeri 90°C olarak belirlendi. Krishnan and Chandra (1983) yapmış oldukları çalışmada *B. licheniformis* CUMC305 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazının optimum sıcaklığı 90°C, Mamo and Gessesse, (1999) *Bacillus* sp.  $\alpha$ -amilaz I ve II'nin optimum sıcaklığını sırasıyla 75 ve 80°C olarak tespit etmişlerdir. Literatürdeki bu çalışmalarda belirlenen optimum sıcaklık değerleri, saflaştırdığımız enzimin optimum sıcaklık değeri ile uyumludur.

Literatürde belirtilen diğer optimum sıcaklık değerleri ise; Hamilton *et al.* (1999) *Aspergillus* sp. ve *Rhizopus* sp. amilazları için optimum sıcaklığı 30°C-50°C, Lin *et al.* (1998) *Bacillus* sp. TS-23 için optimum sıcaklık 70°C, Hamilton *et al.* (1998) *Bacillus* sp. IMD 434 65°C, Hamilton *et al.* (1999) *Bacillus* sp. TS-435 65°C, Demirkan *et al.* (2005) *Bacillus amyloliquefaciens* 55°C, Ueda *et al.* (2008) *Eisenia foetida* 50°C, Liu and Xu, (2008) *Bacillus* sp. YX-1 50°C olduğunu rapor etmişlerdir. Tüm bu verilere dayanarak SO7 termofilik  $\alpha$ -amilaz enziminin oldukça yüksek sıcaklıktaki optimum aktivite değeri ile endüstriyel açıdan önemli olabileceğini söyleyebiliriz.

*B. licheniformis* SO7'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi için sıcaklık kararlılığının belirlenmesi amacıyla 70-100°C aralığında 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda aktivite ölçümü gerçekleştirildi. *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amilaz enziminin 60-70°C aralığında 60 dk (Kim *et al.* 1999), *Cryptococcus* sp. S2  $\alpha$ -amilaz enziminin ise 30-90°C aralığında 30 dk kararlı kaldığı rapor edilmiştir (Balkan, 2008). Mamo and A. Gessesse, (1999)'da yapılan çalışmada ise *Bacillus* sp.  $\alpha$ -amilaz I ve II enzimlerinin 80°C'de 60 dk boyunca aktivitelerinin %50'sini korudukları belirtilmiştir. *B. licheniformis* SO7 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin 70°C-80°C sıcaklık aralığında 90. dk sonunda aktivitesinin %80'den fazlasını koruduğu tespit edildi. *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens*'in yüksek sıcaklık kararlılığı olan  $\alpha$ -amilazlar ürettiği uzun yıllardan beri bilinmektedir (Haki and Rakshit 2003). Termotabil amilazlar endüstriyel işlemlerde, kontaminasyon riskinin azaltılması, harici soğutma ile maliyetin düşürülmesi, substratların daha iyi çözülebilmesi, pompalama ve karıştırmaya izin veren düşük vizkoziteden dolayı kullanım avantajlarına sahiptir (Naidu and Saranraj 2013). Özellikle yüksek sıcaklık değerlerinde aktif olan  $\alpha$ -amilazlar nişasta endüstrisi için oldukça önemlidir (Dheeran *et al.* 2010). Tüm bu sonuçlara göre *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enzimi sıcaklığa karşı yüksek termal stabiliteye sahip ve endüstriyel proseslerdeki uygulamalar için de oldukça güçlü bir aday olduğu söylenebilir.

Metal iyonları amilaz üretiminde önemli rol oynamaktadır. Büyüme ortamına eklenen metal iyonları mikroorganizmanın büyümesini ve daha yüksek enzim üretimini

sağlamaktadır. Eğer enzim metal iyonuna çok sıkı bağlıysa ve doğal yapısını korumak için metal iyonuna ihtiyaç duyuyorsa bu şekildeki enzimlere metalloenzimler denir. Metal iyonlarına daha zayıf bağlanan ve sadece katalitik fonksiyon için metal iyonlarına gerek duyan enzimler ise metal aktif enzimler olarak adlandırılır. Metal aktif ve metalloenzimler için metal iyonları reaksiyon sırasında gelişebilen negatif yük veya elektron yoğunluğunu dengeleyerek elektrofilik katalizde rol oynamaktır. Birçok  $\alpha$ -amilaz metalloenzim yapısındadır ve aktivite, yapısal kararlılık ve stabilite için kalsiyum iyonuna ihtiyaç duymaktadır (Sudha 2012).  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Mn}^{2+}$  iyonlarının SO7  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlendi. Her iki konsantrasyon değerinde de  $\text{K}^+$  iyonunun enzimi aktive ettiği;  $\text{Mg}^{2+}$  iyonunun varlığında ise enzim aktivitesinin %85'inden fazlasını koruduğu tespit edildi. *B. licheniformis* AI20  $\alpha$ -amilazının  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$ 'nin sırasıyla %75 ve 45 oranında aktivitede kayba neden olduğu belirlenmiştir. (Abdel-Fattah *et al.* 2013). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında Okolo *et al.* (2000) yaptıkları çalışmada amilaz enziminin  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  gibi metal iyonlarına ihtiyaç duyduğunu,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  varlığında ise inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Goyal *et al.* (2005) *Bacillus* sp. I-3  $\alpha$ -amilazı için  $\text{FeSO}_4$  ve  $\text{MnSO}_4$  varlığında aktivitenin arttığını bildirmişlerdir. 1 mM konsantrasyonda  $\text{Zn}^{2+}$  iyonunun *Cryptococcus* sp. S-2  $\alpha$ -amilaz enzimini %87,6 oranında inhibe ettiği  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarının ise enzim aktivitesini etkilemediği rapor edilmiştir (Balkan, 2008). Demirkan *et al.* (2005) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amilaz enzimi için 1 mM metal iyonu konsantrasyonun 5 mM'a göre aktivitede daha etkili olduğunu  $\text{Mg}^{2+}$  iyonunun aktiviteyi arttırdığını,  $\text{Fe}^{2+}$ , ve  $\text{Zn}^{2+}$ 'nin enzim aktivitesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Elde edilen sonuçlar literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırıldığında; elde edilen sonuçların  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  metal iyonlarının inhibe edici ve  $\text{K}^+$  iyonunun ise aktive edici etkisiyle uyumlu olduğu görülmektedir.

*B. licheniformis* SO7'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisinin belirlenmesi amacıyla; serin spesifik inhibitörü olan PMSF; SH-grubu inhibitörü olan  $\beta$ -merkaptetanol; sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril oksidasyon ajanı olan DTNB kullanıldı (Koç 2015). Elde edilen veriler sonucunda

yalnızca  $\beta$ -merkaptotanol varlığında  $\alpha$ -amilaz enziminin inhibe olduğu görüldü. Genel olarak diğer inhibisyon ajanlarına karşı amilaz enziminin aktivitesini %80-96 arasında koruduğu belirlendi. SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin 10 mM PMSF varlığında aktivitesinin %96'sını koruduğu belirlendi. Mezofilik canlılara göre termofil ve ekstrem termofil organizmalarda serin amino asitinin düşük seviyede olması termostabilitenin en önemli nedenlerinden birisi olarak düşünülmektedir (Szilagyi and Zavodszky 2000). PMSF serin proteaz inhibitörü olarak bilinmekte aynı zamanda sistein protezları da inhibe etme özelliğine sahip bir inhibitör ajanıdır. DTNB ise sülfidril gruplarıyla reaksiyona giren yüksek sıcaklık ve pH'da hidrolize karşı duyarlı olan bir İnhibisyon ajanıdır. DTNB varlığında SO7 amilaz enzim aktivitesinin %80 oranında korunduğu belirlendi. EDTA şelat ajanı olarak bilinmekte demir, magnezyum ve kalsiyum gibi iyonlarla reaksiyona girmektedir.  $\alpha$ -amilaz enziminin 55°C sıcaklıkta EDTA varlığında aktivitesinin %86'sını koruduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre SO7 amilaz enzimi metal bağımsız bir enzim olarak düşünülebilir. Birçok metal katyonları, genellikle ağır metal iyonları, sülfidril grup ajanları, N-bromosüksinimid, p-hidroksilmerkuribenzoik asit, iyodoasetat, BSA, EDTA ve EGTA'nın  $\alpha$ -amilazı inhibe ettiği bildirilmiştir (Gupta *et al.* 2003). Okolo *et al.* (2000) yapmış oldukları çalışmada amilaz enziminin EDTA ve N-bromosüksinamid varlığında inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Kalpana and Pandian (2014) tarafından yapılan çalışmada amilaz enziminin, 1 mM EDTA'dan etkilenmeden kaldığı ve 5 mM konsantrasyonda bile %96 aktivite sergilediği için, oldukça dayanıklı olduğu rapor edilmiştir. Sonuçlar literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında elde edilen  $\alpha$ -amilaz enzimi yüksek konsantrasyonda (5 Mm) EDTA varlığından yüksek seviyede etkilenmemiş, diğer inhibisyon ajanlarına karşı ise aktivitesini büyük oranda koruduğu belirlenmiştir. EDTA gibi şelatlayıcı ajanlar deterjan içeriklerinde sıklıkla tercih edilmektedir. Enzimin EDTA varlığında aktivitesinin büyük çoğunluğunu koruması deterjan endüstrisi açısından önemini daha da arttırmaktadır. Bu veriler SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin endüstriyel alanda özellikle deterjan endüstrisi için potansiyel bir aday olabileceğini göstermektedir.

*B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin düşük konsantrasyonda (%10) DMSO, gliserol, metanol ve aseton varlığında aktivitesinin arttığı; etanol için ise tüm

konsantrasyon değerlerinde enzim aktivitesinin %98 olduğu tespit edildi. %10 konsantrasyonla karşılaştırıldığında %30'luk gliserolün enzim aktivitesini %9 oranında arttırdığı görüldü. %10'luk konsantrasyonda aseton amilaz aktivitesini arttırırken artan konsantrasyonun (%30) enzim aktivitesinin %73'e düşmesine neden olduğu tespit edildi. %10 metanol varlığında amilaz aktivitesi %109 iken %30 metanol konsantrasyonunda aktivite %97 olarak belirlendi. Abdel-Fattah *et al.* (2013) yapmış oldukları çalışmada *B. licheniformis* AI20 tarafından üretilen  $\alpha$ -amilaz enziminin %10 oranında etanol, metanol, isopropanol, aseton gibi çözücüler ile gliserol gibi kimyasallara karşı büyük bir kararlılık sergilediğini, %20 konsantrasyonda ise bazı çözücülerin (etanol, metanol, isopropanol) enzim aktivitesinde az da olsa bir düşüşe neden olduğunu belirtmişler, aseton ve gliserolün ise enzim aktivitesini etkilemediğini rapor etmişlerdir.

*B. licheniformis* SO7'den saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enzimi üzerine yüzey aktif maddelerin etkisinin incelenmesi amacıyla %1 konsantrasyonda SDS, Tween-20, Tween-80 ve TritonX-100 kullanıldı. Sonuçlar incelendiğinde  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi %1'lik SDS, Tween-20, Tween-80 ve TritonX-100 için sırasıyla %97, %105, %87 ve %106 olarak belirlendi. Arikan *et al.* (2008) yapmış oldukları çalışmada *Bacillus* sp. A3-15  $\alpha$ -amilaz enziminin %1 SDS varlığında aktivitesinin % 18'ini kaybettiğini bildirmişlerdir. %1 konsantrasyonda Tween-20 ve TritonX-100 enzim aktivitesini arttırırken SDS ve Tween-80'nin aktiviteyi az da olsa azalttığı görüldü. Lo *et al.* (2001) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus* sp. TS-23 amilaz enziminin %6'lık SDS bulunan ortamda 30°C'de 1 saat inkübasyon sonunda stabilitesini koruduğu, 60°C'de ise amilaz enziminin denatüre olduğu bildirilmiştir. Kalpana ve Pandian (2014)'de yapılan çalışmada ise %1 SDS varlığında amilaz enziminin aktivitesini önemli oranda (%68) kaybettiği, enzimin diğer deterjanlara (Triton-X ve Tween80) karşı kararlılığını (%85) koruduğu belirtilmiştir. Tüm bu sonuçlar literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin yüzey aktif maddelere karşı olduğu ve dolayısıyla deterjan endüstrisi için kullanıma uygun bir enzim olabileceği söylenebilir.

$\alpha$ -amilaz enzimi üzerine 0,5-10 mM konsantrasyon aralığında  $\text{CaCl}_2$ 'nin etkisi incelendi. 0,5, 1, 5 ve 10 mM  $\text{CaCl}_2$  varlığında amilaz enzim aktivitesini sırasıyla %100, %102, %107 ve %124 olduğu tespit edildi. Amilaz enziminin aktivite, yapısal bütünlük ve stabilite için özellikle  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarına ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir (Gupta *et al.* 2003; Sivaramakrishnan *et al.* 2006; Hussain *et al.* 2013).  $\alpha$ -amilazların sıcaklık kararlılığının özellikle ortamda  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu bulunduğunda çok daha fazla olduğu bilinmektedir.  $90^\circ\text{C}$ 'de ortama 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ilave edildiğinde enzimin yarı ömrünün 15 dk olduğu, kalsiyum yokluğunda ise 3 dk olduğu saptanmıştır. Kalsiyum iyonu varlığında termal inaktivasyona karşı amilaz termostabilitesinin geliştiği, bu durumun enzimin A ve B domain köprüleri arasındaki ana kalsiyum bağlanma bölgesinde yer alan Ca-Na-Ca metal üçlüsü ile etkileşime girmesi sonucunda gerçekleşebileceği bildirilmiştir (Hmidet *et al.* 2010). Sık şekilde rastlanmasa da literatürde bu durumun tersi örnekler görmek de mümkündür. Jin *et al.* (2001) yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. JF2  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesinin,  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu ile bağlantılı olmadığını rapor etmişlerdir. Egas *et al.* (1998) tarafından yapılan çalışmada *Thermus filiformis* Ork A2  $\alpha$ -amilaz enziminin 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu varlığında aktivitesi 1,2 kat, 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu varlığında 1,29 kat, 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu varlığında 1,34 kat, 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu varlığında ise 1,41 kat arttığı bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında *B. licheniformis* SO7 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -amilaz enziminin  $\text{Ca}^{2+}$  iyonunun artan konsantrasyonuna bağlı olarak enzim aktivitesinin arttığı ve literatürdeki verilerle örtüştüğü görüldü.

Bu çalışmada *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilaz enziminin farklı substratlara karşı ilgisi araştırıldı ve en yüksek değer pirinç nişastasında görüldü. SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin buğday, patates nişastası ve maltotrioza karşı ilgisi sırasıyla %99, %73 ve %39 olarak belirlendi. Ham nişastanın hidrolize edilmesi ile enzimin ham nişastaya ilgisi arasında doğrusal bir orantı vardır. Bununla birlikte enzimin nişasta granüllerine karşı ilgi mekanizması hala tam olarak açıklanmış değildir. Bazı araştırmacılar nişasta-amilaz enzimi arasındaki ilginin enzimin sahip olduğu C-terminal bağlayıcı domain sayesinde olabileceğini açıklamışlardır (Sarıkaya *et al.* 2000).  $\alpha$ -amilaz enziminin substrat spesifitesi mikroorganizmalar arasında farklılık göstermektedir. Amilazlar amiloz,

amilopektin, siklodekstrin, glikojen ve maltotrioz dahil olmak üzere diğer substratlar ile karşılaştırıldığında, nişastaya karşı daha yüksek spesifite ortaya koymaktadırlar (Sharma and Satyanarayana 2013). *Bacillus* sp. IMD 370 amilaz enzimi (Balkan, 2008); *Bacillus* sp. IMD 434 ve IMD 435  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin herhangi bir pH değerinde nişastanın hiçbir çeşidine ilgisinin olmadığı bildirilmiştir (Hamilton *et al.* 1998, 1999). Lin *et al.* (1998) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus* sp. TS-23  $\alpha$ -amilaz enziminin mısır, pirinç ve buğday nişastalarına karşı ilgi yüzdesi sırasıyla %98,3, %84,9 ve %52,4 olarak bulunmuştur. Ayrıca *Bacillus* sp. I-3  $\alpha$ -amilaz enziminin ham patates granüllerine %94 oranında ilgi gösterdiği rapor edilmiştir (Goyal *et al.* 2005). Sonuç olarak *B.licheniformis* SO7 amilazının nişasta substratlarına (patates, buğday,pirinç nişastaları) daha fazla ilgisinin olduğu görüldü.

Bu tez çalışması kapsamında *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enzimi için patates nişastası varlığında kinetik parametreler olan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla sırasıyla 3,24 mg/mL, 204,08 EU/mL olarak belirlendi. *Bacillus subtilis* KIBGE HAS ekstraselüler  $\alpha$ -amilazı,  $K_m$  değeri 2,68 mg/mL  $V_{max}$  değeri ise 1773 U/mL (Bano *et al.* 2011), *B. licheniformis* CUMC 305  $K_m$  ve  $V_{max}$  değeri sırasıyla 1,274 mgglukoz, 0,738 mL dk (Krishnan and Chandra 1983). *Bacillus subtilis* ITBCCB148  $\alpha$ -amilaz enziminin  $K_m$  değeri 2,5 mg/mL,  $V_{max}$  değeri ise 192,3  $\mu$ mol/mL dak olarak tespit edilmiştir (Yandri *et al.* 2010).

Bu çalışmada elde edilen veriler sonucunda; *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin organik çözücüler ve yüzey aktif maddeler varlığında dayanıklı, termofil ve termostabil özelliklere sahip olduğu görülmektedir. Günümüzde endüstriyel uygulamalarda kullanımı için  $\alpha$ -amilazların kolay ve düşük maliyetle saflaştırılabilme, yüksek ısıl kararlılık gösterebilme ve aktivitenin pH'dan etkilenmemesi gibi özelliklere sahip olması beklenmektedir. Tek basamakta saflaştırılan bu enzim düşük maliyet ve iş gücü gerektiren saflaştırma yöntemleri için iyi bir adaydır. Bununla birlikte saflaştırma verimi iyileştirilebilir.  $\alpha$ -amilaz enzimi yüksek sıcaklık aktivitesi ve stabilitesiyle özellikle gıda endüstrisi başta olmak üzere yüksek sıcaklık toleransına ihtiyaç duyulan bütün endüstriyel alanlar için uygun bir enzim olarak düşünülmektedir. Özellikle

alkalin, termostabil ve yüzey aktif ajanlara dayanıklı enzimler, deterjan formülasyonunda öncelikli bir yere sahiptir. Sahip olduğu diğer özellikler ile birlikte yüzey aktif maddeler varlığında oldukça iyi bir stabiliteye sahip olması SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin deterjan endüstrisi içinde ideal bir endüstriyel enzim olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak; *B. licheniformis* SO7  $\alpha$ -amilaz enziminin sahip olduğu biyokimyasal özellikleri ile endüstriyel alanlarda kullanım için iyi bir potansiyele sahip olduğu ve ekonomik açıdan değerlendirilebilir özellikte olduğu düşünülmektedir.



## KAYNAKÇA

- Abdel-Fattah, Y.R., Soliman, N.A., El-Toukhy, N.M., El-Gendi, H., Ahmed, R.S. 2013. Production, Purification, and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus licheniformis* Isolate AI20. Journal of Chemistry. Volume 2013, Article ID 673-173, 11 pages.
- Abou Dobra, M.I., El-Sayed, A.K., El-Fallal, A.A, Omar, N.F. 2011. "Production and partial characterization of high molecular weight extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* isolated from Egyptian soil", Polish Journal of Microbiology, 60 (1), 65-71.
- Abou-Zeid, A.M., 1997. Production, purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*. Microbios 89: 55-66.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden Ėzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 484s.
- Aira, S., Kilal, K., ve Imanaka, A., 1983. Cloning and Expression of Thermostable  $\alpha$ -Amylase Gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 1059-1065.
- Aiyer, P.V., 2005. Amylases and their applications. African Journal of Biotechnology. 4 (13):1525-1529.
- Al-Quadan, F., Akel, H. ve Natshi, R., 2009. Characteristics of a Novel Highly Thermostable and Extremely Thermophilic Alkalitolerant Amylase from Hyperthermophilic *Bacillus* Strain HUTBS71. Journal of Biological Sciences. 3, 67-74.
- Arikan, B., 2008. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. Bioresource Technology. 99, 3071-3076.
- Arslan, S., 2017. Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Asghari, S.M., Khajeh, K., Ranjbar, B., Sajedi, R.H. and Manesh, H.N. 2004. Comparative studies on trifluoroethanol (TFE) state of a thermophilic alpha-amylase and its mesophilic counterpart: limited proteolysis, conformational analysis, aggregation and reactivation of the enzymes. International Journal of Biological Macromolecules. 34(3):173-179.
- Ası, T., 1996. Tablolarla Biyokimya, Tayf Ofset, 71-116.
- Ayhan, K. 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, 43-44. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.

- Azad, M.A.K., Bae, J.H., Kim, J.S., Lim, J.K., Song, K.S., Shin, B.S. ve Kim, H.R., 2009. Isolation and characterization of a novel thermostable  $\alpha$ -amylase from Korean pine seeds. *New Biotechnology*, 26, 143-149.
- Balkan, B., 2008. Katı Substrat Fermentasyonu ile Ham Nişastayı Parçalayan Yeni Bir Fungal Amilaz Üretimi Saflaştırılması ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Baltaş, N., 2012. *Anoxybacillus gonensis* Z4 Suşundan Ekstraselüler  $\alpha$ -Amilaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Bamforth, C.W., 2003. Barley and Malt Starch in Brewing: A General Review. *MBAA TQ* Vol. 40, No. 2, pp. 89-97.
- Bano, S., Ali, S., Qader, U., Aman, A., Syed, M. N. ve Azhar, A., 2011. Purification and Characterization of Novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *AAPS PharmSciTech.*, 12, 255-261.
- Bender, H., 1993. Purification and characterization of a cyclodextrin-degrading enzyme from *Flavobacterium* sp., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 714-719.
- Bernfeld, P., 1955. Amylases, alpha and beta. In: Colowick, S. P. and Kaplan, N. O (eds.). *Methods in enzymology*. New York: Academic Press. v. 1. pp. 149-158.
- Bertoldo, C., and Antranikian, G., 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology.*, 6, 151-160.
- Bhutto, M.A., Umar, D., Umar, M., 2010. Effect of Alternative carbon and nitrogen sources on production of alpha-amylase by *Bacillus megaterium*. *World Applied Sciences Journal (Special Issue of Biotechnology & Genetic Engineering)*:8- 85-90.
- Bıçak, Ö., Ekmekçi, Z., 2005. Polisakkaritlerin Flotasyonda Bastırıcı Olarak Kullanımı ve Soğurum Mekanizmaları. *Madencilik. Cilt 44, Sayı 1, Sayfa 19-31.*
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J., 1996. *Protein Methods* (2<sup>nd</sup> Edt). Wiley-Liss Press, USA. 414s.
- Boyer, F.W., Ingle, M.B., and Mercer, G.D. 1972. *Starch*. 31:66-71
- Bozkurt Uludağ, Y., 2000. İmmobilize Glukoamilaz İle Maltodekstrinden Glukoz Üretimi. *Gebze Yüksek Teknoloji ve Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü.*
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Burhan, A., Ünaldi, N., Coral, G., Colak, O., Aygan, A., ve Gülnaz, O. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. *Process Biochemistry*. 38:1397-1403
- Çetinkaya, E., 2011. Gıdalardan izole edilen *Enterobacter* sp. ve *Cronobacter sakazakii* suşlarının biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 88s.(Basılmamış).
- Chai, Y.Y, Rahman R.N.Z.R.A., Illias, R.M., Goh, K.M., 2012. "Cloning and characterization of two new thermostable and alkalitolerant  $\alpha$ -amylases from the *Anoxybacillus* species that produce high levels of maltose", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 39, 731-741.

- Chitradon, L., Mahakhan, P., and Bucke, C., 2000. Oligosaccharide synthesis by reversed catalysis using  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 10, 273–280.
- Chloroflexus aurantiacus*. *Appl. Environ Microbiol.*, 58, 2490-2494.
- Cowan, D., 1996. Industrial enzyme technology, TIBTECH, No. 14, 177-178.
- Cowan, D.A., 1997. Thermophilic Proteins: Stability and function in aqueous and organic Solvents. *Comp. Biochem., Physiol.* Vol. 118A, No:3, 429-438.
- Crabb, W.D., Mitchinson, C., 1997, Enzymes involved in the processing of starch to sugars, *Trends Biotechnology*, No. 15, 349-352.
- D'Amico, S., Gerday C., Feller G., 2000. "Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent  $\alpha$ -amylases", *Gene*, 253, 95–105.
- Deb, P., Talukdar, S.A., Mohsina, K., Sarker, P.K., Abu Sayem, S.M., 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springer Plus*. 2:154.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., 1981. In *Industrial Microbiology*.
- Demirkan, E. S., Mikami B., Adachi M., Higasa, T. ve Utsumi S., 2005.  $\alpha$ -amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. Coli*. *Process Biochemistry*, 40, 2629-2636.
- Dheeran, P., Kumar, S., Jaiswal, Y.K., Adhikari, D.K., 2010. "Characterization of hyperthermostable  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus* sp. IPTN", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1857–1866.
- Divakaran, D., Chandran, A., Chandran, P., 2011. Comparative study on production of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 1397-1404.
- Egas, M.C.V., da Costa, M. S, Cowan, D.A., Pires, E.M.V., 1998. "Extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: purification and biochemical characterization", *Extremophiles*, 2, 23-32.
- Eichler, J., 2001. Biotechnological uses of archaeal extramozyme. *Biotechnology Advances*, 19: 261-278.
- El-Fallal, A., Abou Dohara, M., El-Sayed, A., Omar, N., 2012. "Starch and Microbial  $\alpha$ -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications", In: Chang C., "Biochemistry, Genetics and Molecular Biology", Humana Press.
- Erich, H., 1975. Chromatography, A laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods. Van Reinhold Comp., New York. 968s.
- Everly, C., and Alberto, J., 2000. Stressors, stress and survival: overview. *Front. Biosci.* 5, 780–786.
- Fairbairn D. A., Priest F. G. and Stark J. R., 1986, Extracellular amylase synthesis by *Streptomyces limosus*, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol 8., 89-92.
- Fontana, J.D., Gebara, M., Blumel, M., Schineider, H., Mackenzie, C.R., Fohnson, K.G., 1988.  $\alpha$ -4-O-methyl-D-glucoronidase component of xylanolytic complexes. *Methods Enzymol.* 160: 560-571.
- Fujiwara, S., 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resource. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6): 518-525.
- Garrity, G.M., Holt, J.G., 2001. The road map to the manual, p. 119–166. In G. M. Garrity (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, New York, N.Y.

- Gautam, B., Karki, T.B., Panta, O.P., 2013. Optimization of Cultural Conditions for Solid State Fermentation of Amylase Production by *Aspergillus* species Nepal Journal of Science and Technology Vol. 14, No. 1 67-74.
- Göksungur, Y., and Güvenç, U., 2002. Kalsiyum Aljinatta Hücre Ğmmobilizasyonu ve biyoteknolojideki Uygulamaları. Gıda 27(6): 511-518.
- Gomes, J. and Steiner, W., 2004. The biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. Food Technology and Biotechnology, 42(4): 223- 235.
- Goyal, N., Gupta, J.K. and Soni S.K., 2005, A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch, Enzyme and Microbial Technology, 37 (7), 723-734.
- Guo, B., Bi, Y., 2002. "Cloning PCR Products", in: Chen, B.Y. and Janes, H.W, Editors, "PCR Cloning Protocols", Humana.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan B., 2003. "Microbial amylases: a biotechnological perspective", Process Biochemistry, 38, 1599-1616.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K., 2003. "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review", Bioresource Technology, 89,17-34.
- Hamer, R.J., 1995. Enzymes in the baking industry. In: Tucker G. A, Woods L. F. J., editors. Enzymes in food processing. Galsgow: Blackie Academic and Professional. 190-222.
- Hames, B.D. and Rickwood, D., 1996. Gel Electrophoresis of Proteins A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford.383s.
- Hames, B.D., Rickwood, D., 1990. Gel electroforesis of proteins, A practical approach, Oxford University Press, 1-149.
- Hamilton, L. M., Kelly, C. T. ve Fogarty W. M.,1999. Production and properties of the raw starch-digesting  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. Process Biochemistry, 35, 27–31.
- Hamilton, L. M., Kelly, C. T. ve Fogarty W. M.,1999. Purification and properties of the raw starch-degrading  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. Biotechnology Letters. 21, 111–115.
- Harmsen, D., Karch, H., 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. Am. Soc. Microbiol. New., 70: 19–24.
- Hashim, S.O., Delgado, O.D., Martinez, M.A., Kaul, R.H., Mulaa, F.J., Mattiasson, B., 2005. Alkaline active maltohexaose-forming aamylase from *Bacillus halodurans* LBK 34. Enzyme.Microbial Technol.,36:139-146.
- Hayashida, S., Teramoto, Y. ve Inoue, T., 1988. Production and characteristics of raw potato starch digesting  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* 65. Appl. Environ. Microbiol., 54, 1516-1522.
- Hmidet, N., Bayoudh, A., Berrin, J.G., Kanoun, S., Juge, N. ve Nasri, M., 2008.
- Hmidet, N., Nedra, E.H.A., Nahed, Z.F., Anissa, H., Moncef, N., Alya, S.K., 2010. Chicken feathers: a complex substrate for the co-production of  $\alpha$ -amylase and proteases by *Bacillus licheniformis* NH1. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 37: 983–990.
- Hofemeister, B., Konig, S., Hoang, V., Engel, J., Mayer, G., Hansen, G., Hofemeister, J., 1994. "The gene amyE (TV1) codes for a nonglucogenic  $\alpha$ -amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* 94-2A in *Bacillus subtilis*", Applied and Environmental Microbiology, 60 (9), 3381-3389.

- Hols, P., Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N., Delcour, J., 1994. Use of Expression Secretion Signals and Vector Free Stable Chromosomal Integration In Engineering of *Lactobacillus planetarium* for Alfa Amylase and Levanase Expression. *App. And Environ. Microbiai.* 60 (5):1401- 1413.
- Horikoshi, K., 1996. Alkaliphiles-from an industrial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, 18:259-270.
- Hough, D.W., Danson, M.J., 1999. "Extremozymes", *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 39-46.
- Hussain, I.F., Siddique, M.S., Mahmood, S.I., Ahmed, 2013. A review of the microbiological aspect of  $\alpha$ -amylase production. *Int. J. Agric. Biol.*, 15: 1029–1034.
- Ikram-Ul-Haq, U.H., Mahmood, Z., Javed, M.M., 2012. Solid state fermentation for the production of  $\alpha$ -amylase by *Paenibacillus amylolyticus*. *Pak. J. Bot.*, 44: 341-346, Special Issue.
- Itkooor, P., Shida, O., Tsukagoshi, N., and Udaoka, S., 1989. Screening for raw starch digesting bacteria, *Agricultural Biology and Chemistry*, 53, 53-60.
- Ivanova, V., Dobрева, E., and Emanuilova, E., 1993. Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*, *J. Biotechnol.*, 28, 277–289.
- Jin, F., Li, Y., Zhang, C., Yu, H., (2001), "Thermostable  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp. J.F strain", *Process Biochemistry*, 36, 559-564.
- Kahn, M., House, B., (2004), "Method for cloning PCR products without restriction or ligation enzymes", United States Patent Application, 20040166512.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamioğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, A.M., 2000. *Biyokimya*, Nobel Yayın Dağıtım, 163-165, 246-247.
- Kandra, L., 2003.  $\alpha$ -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 666–667.
- Kaneko T., Ohno T. ve Ohisa N., 2005, Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amylase from a *Streptomyces* sp. isolated in a milling factory. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69(6), 1073-1081.
- Kanno, M., 1986. *Bacillus acidocaldorus*  $\alpha$ -amylase that is highly stable to heat under acidic conditions. *Agric. Biol. Chem.* 50 (1): 23-31.
- Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A., 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1). *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 5(1).
- Kaur, J., Sharma, R., (2006), "Directed evolution: An approach to engineer enzymes", *Critical Reviews in Biotechnology*, 26, 165–199.
- Kaur, P., Vyas, A., 2012. Characterization and optimal production of alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. DLB 9. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(11), pp. 2674-2681.
- Kelly C.T., Tigue M.M., Doyle E.M., Fogarty W.M., 1995. The raw starch degrading alkaline amylase of *Bacillus* sp. IMD 370, *Journal of Indian Microbiology*, 15: 446-448.
- Kim, J.S., Cha, S.S., Kim, H.J., Kim, T.J., Ha, N.C., Oh, S.T., Cho, H.S., Cho, M.J., Kim, M.J., Lee, H.S., Kim, J.W., Choi, K.Y., Park, K.H. ve Oh, B.H., 1999.

- Crystal structure of a maltogenic amylase provides insights into a catalytic versatility. *J. Biol. Chem.*, 274, 26279-26286.
- Koç, Ö., 2015. *Aspergillus fumigatus* HBF125 Ekstraselüler  $\alpha$ -amilazının üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Koç, Ö., Metin K. 2010. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase produced by *Aspergillus flavus* HBF34. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 9(23), pp. 3414-3424, 7.
- Kolbert, C.P., Persing, D.H., 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2: 299–305.
- Krishnan, T., and Chandra, A.K., 1983. Purification and Characterization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 2, 430-437.
- Kumar, H.D. and Nussinov, R., 2001. How Do Thermophilic Proteins Deal with Heat? A review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 1216- 1233.
- Kumar, S., and Nussinov, R., 2001. How do thermophilic proteins deal with heat? A review. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 1216–1233.
- Kuruki, T., and Imanaka, T., 1999. The Concept of the alpha amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *J. of Bioscience and Bioengineering*, 87(5): 557-565.
- Laderman, K.A., Davis, B.R., Krutzsch C.H., Lewis, M.S., Griko, Y.V., Privalov, P.L., and Anfinsen, B.C., 1993. The purification and characterization of an extremely thermostable alpha amylase from the hyperthermophilic Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 32:15, 24394-24401.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature*, London, 227,680.
- Leemhuis, H., Dijkstra, B.W. and Dijkhuizen, L. 2002. Mutations converting cyclodextrin glycosyltransferase from a transglycosylase into a starch hydrolase. *FEBS Letters*, 514:189-192.
- Li, C., Evans, R. M., 1997. “Ligation independent cloning irrespective of restriction site compatibility”, *Nucleic Acids Research*, 25 (20), 4165–4166.
- Li, D., Park, J. T., Li, X., Kim, S., Lee, S., Shim, J.H., Park, S.H., Cha, J., Lee, B.H., Kim, J.W., Park, K.H., 2010. “Overexpression and characterization of an extremely thermostable maltogenic amylase, with an optimal temperature of 100 8C, from the hyperthermophilic archaeon *Staphylothermus marinus*”, *New Biotechnology*, 27 (4), 300-307.
- 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., 2003. “Cloning and characterization of a thermostable intracellular  $\alpha$ -amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8”, *Research in Microbiology*, 154, 681-687.
- Lin L. L., Chyau C.C. and Hwei Hsu W., 1998. Production and properties of a raw starch degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28, 61-68.
- Liu X.D., Xu Y., 2008. A novel raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization, *Bioresource Technology*, 99; 4315-4320.

- Lo, H.F., Lin, L.L., Chen, H.L., Hsu, W.H., and Chang, C.T., 2001. Enzymatic properties of SDS resistant *Bacillus* sp. TS-23 alpha amylase produced by recombinant *E.coli*. *Process Biochem.*, 36: 743-750.
- Lowry, O.H., Rosebough, N.J. Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biology and Chemistry*, 193, 265-275.
- Lupski, J.R. and Weinstock, G.M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*. 174, 4525– 4529.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J., 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Maldonado, H.G. and Lopez O.P., 1995. Amylolytic enzymes and products derived from starch, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 373-403.
- Mamo, G., and Gessesse, A., 1999. Purification and characterization of two rawstarch-digesting thermostable  $\alpha$ -amylases from a thermophilic *Bacillus*, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 433-438.
- McDowall J. 2006. Protein of the Month-alpha-Amylase. Available from: [http://www.ebi.ac.uk/interpro//potm/2006\\_2/Page1.htm](http://www.ebi.ac.uk/interpro//potm/2006_2/Page1.htm) (accessed March 30).
- Mendu, D.R., Ratnam, B.V.V., Purnima, A., Ayyanna, C., 2005. Affinity chromatography of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 37 (2005) 712–717.
- Menzel, C., Lerch, T., Schneider, K., Weideman, R., Tollnick, C., Kretzmer, G., Scheper, T., Schugert, K., 1998. Application of biosensors with an electrolyte isolator semiconductor capacitor (EISCAP) transducer for process monitoring. *Process Biochemistry*, 33: 175- 180.
- Metin, K., 2007. Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri. *Moleküler Biyoloji (Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karatağ, M. ve Tanyolaç, B.)*, Nobel Yayıncılık, Sayfa 555-598, Ankara.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, *Analytic Chemistry*, Nq. 31, 426-428.
- Mojsov, K., 2012. Microbial  $\alpha$ -Amylases and their industrial applications: A Review. *IJMIE Volume 2, Issue 10, ISSN: 2249-0558*.
- Morgan, F., Priest, F.G., 1981. Characterization of Thermostable  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis* NCTB 6346. *J. Applied Microbiology* 50: 107-114.
- Muralikrishna, G., and Nirmala, M., 2005. Cereal  $\alpha$ -amylases-an overview. *Carbohydrate Polymers*, 60, 163-173.
- Naidu, M.A., Saranraj, P., 2013. Bacterial Amylase: A Review. *Int J Pharmaceutical & Biological Arch.* 4(2):274 – 287.
- Najafi, M.F., Deobagkar, D., and Deobagkar, D., 2005. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus Subtilis* AX20. *Protein Expression and Purification*, 41, 349-354.
- Najafi, M.F., Kembhavi, A., 2005. One step purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from marine *Vibrio* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 36, 535-539.
- Nazmi, A.R., Reinisch, T., and Hinz H.J. 2006. Ca-binding to *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase (BLA). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453, 18–25.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2004. *Enzymes. Lehninger Principles of Biochemistry* (Nelson, D.L., Cox, M.M) W. H. Freeman, p. 190-249.

- Nguyen, Q.D., Rezessy-Szabó, J.M., Claeysens, M., Stals, I., Hoschke, Á., 2002. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 345-352.
- Nielsen, J.E., Borchert, T.V., 2000. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1543: 253-274.
- Nugent, A.P., 2005. Health properties of resistant starch. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 30: 27-54.
- Nwokoro, O., Anthonia, O., 2015. Studies on the production of alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* CB-18. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 14(1):71-75.
- Odibo, F.J.C., Ulbrich-Hofmann, R., 2001. Thermostable  $\alpha$ -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1. *Acta Biotechnology*, 21(2):141-153, Germany.
- Okolo B. N., Ire F. S., Ezeogu L. I., Anyanwu C.U. and Odibo F.J.C., 2000. Purification and some properties of a novel raw starch digesting amylase from *Aspergillus carbonarius*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 329-336.
- Olufunke, F.T., Azeez, I.I., 2013. Purification and Characterization of Beta-Amylase of *Bacillus subtilis* Isolated from Kolanut Weevil, *Journal of biology and life science*. ISSN 2157-6076, vol. 4, No. 1.
- Outtrup, H and Jorgensen, S.T., 2002. The Importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes. (R.Berkley editör) *Applications and systems of Bacillus and relatives*. Blackwell Science Inc., Malden, Mass., 206-218.
- Ozcan, B.D., Baylan, M., Ozcan, N., Tekdal, D., 2010. Characterization of Thermostable  $\alpha$ -amylase from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate DM-15. *Research Journal of Biological Sciences*. Volume: 5(1): 118-124.
- Özçelik, S., 1995. Genel Mikrobiyoloji, Isparta, 1-33s.
- Öztürk, M.T., 2013. Yerel *Bacillus* İzolatlarından Alfa Amilazların Klonlanması ve Rekombinant amy28 Alfa Amilazının Enzim Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol V.T., Singh, D., Mohan, R., 2000. "Advances in microbial amylases", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31, 135–152.
- Parker, K., Salas, M., Nwosu, V.C., 2010. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 5(5): 71 – 78.
- Pfister, P., Hobbie, S., Vicens, Q., Bottger, EC., Westhof, E. 2003b. The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance :relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures. *Biochem.*, 4: 1078– 1088.
- Pfister, P., Risch, M., Brodersen, DE., Bottger, EC. 2003a. Role of 16S rRNA helix 44 in ribosomal resistance to hygromycin B. *Antimicrob. Agents Ch.*, 47: 1496– 1502.
- Poole, C.F., 2003. *The Esence of Chromatography*. Elsevier Science B.V. Amsterdam, 925s.
- Prakash, O., Jaiswal, N., 2010. "Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes", *Appl Biochem Biotechnol.*, 16, 2401-2414.

- Prieto, J.A., Bort, B.R., Martinez, J., Randez-Gil, F., Buesa, C., Sanz, P., 1995. Purification and characterization of a new alpha-amylase of intermediate thermal stability from the yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Biochemistry and Cell Biology*; 73(1-2): 41-9.
- Primarini, D., Ohta, Y., ve Hiroshima, H., 2000. Some enzyme properties of raw starch digesting amylases from *Streptomyces* sp. No. 4, *Starch*, 52, 28-32.
- Puri, S., Arora, M, Sarao, L. 2013. Production and optimization of amylase and glucoamylase using *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*; 3(3): 83-88.
- Purification and biochemical characterization of a novel  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1. Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escheria coli*. *Process Biochemistry*, 43, 499-510.
- Rajagopalan, G., Krishnan, C., 2008. Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour. Technol.*, 99, 3044–3050.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:597-635.
- Rao, M.D., Ratnam, B.V.V., Ramesh, D.V., and Ayyanna, C., 2005. Rapid method for affinity purification of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. *World Journal of Microbiology and Biothecnology*, 21, 371-375.
- Ratanakhanokchai, K., Kaneko, J., Kamio, Y., Izaki, K., 1992. Purification and properties of a maltotetraose- and maltotriose-producing amylase from *Chloroflexus aurantiacus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2490–2494.
- Ratnasri, P.V., Lakshmi, B.K.M., Ambika Devi, K., Hemalatha, K.P.J., 2014. Isolation characterization of *Aspergillus fumigatus* and optimization of cultural conditions for amylase production. *IJRET: International Journal of Research in Engineering and Technology*.ISSN: 2319-1163.
- Reddy, N.S., Nimmagadda, A., Sambasiva Rao, K.R.S., 2003. An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12), pp. 645-648.
- Renge, V.C., Khedkar, S.N.V., Nandurkar, R., 2012. Enzyme Synthesis By Fermentation Method: A Review. *Sci. Revs. Chem. Commun.*: 2(4), 2012, 585-590.
- Riisgaard, S., 1990. "The enzyme industry and modern biotechnology", In: *Proceedings of the Fifth European Congress on Biotechnology*, 1C. Christiansen, L. Munck, J., Villadsen (Ed.), 31408-71610-617-2, Copenhagen.
- Rüdiger, A., Sunna, A., and Antranikian, G., 1994. Enzymes from extreme thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. *Carbohydrases*, 946-961.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kulkarni P. R. 2006. Resistant Starch—A Review *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety* Vol. 5.
- Sankaralingam, S., Shankar, T., Ramasubburayan, R., 2012. Optimization of culture conditions for the production of amylase from *Bacillus licheniformis* on submerged fermentation. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences*. 11/2012; 12(11):1507-1513.

- Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M., and Mikami B., 2000. Comparison of degradation abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases on raw starch granules, *Process Biochemistry*, 35, 711-715.
- Saxena, R.K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P., 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Tech.*, 98:260-265.
- Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O.P., 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50:1-17.
- Shah, I.J., Gami, P.N., Shukla, R.M., Acharya, D.K., 2014. Optimization for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* using submerged fermentation technology. *Basic Research Journal of Microbiology* ISSN 2354-4082 Vol. 1(4) pp.
- Sharma, A., Satyanarayana, T., 2013. Microbial acid-stable  $\alpha$ -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*. 48: 201–211.
- Sharp, R.J., Scawen, M.D. Atkinson, T., 1989. Fermentation And Down Stream Processing Of *Bacillus*. In: Harwood CR (&d) *Bacillus*. *Biotechnology Handbooks*, Vol 2. Plenum Press, New York, pp 255-292.
- Shenoy, B.C., Katwa, L.C., Appu Rao, A.G., Raghavendra Rao M. R. 1985. Fungal glucoamylases. *J. Biosci.*, Vol. 7, Numbers 3 & 4, pp. 399-419.
- Sidkey, N. M., Abo-Shadi, M. A., Balahmar, R., Sabry, R. ve Badrany, G., 2011. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Aspergillus flavus* F2Mbb. *International Research Journal of Microbiology*, 2, 96-103.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., Pandey, A., 2006.  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources-An Overview on Recent Developments. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2): 173-184.
- Sneath, P.H.A., 1986. "Section 13: Endospore-forming Gram-positive rods and cocci"/ Section 16: Identification of Unknown Bacteria", In: Krieg N.R, editor, "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", 2nd edition, Williams and Wilkins.
- Souza, P.M., Magalhães, P.D.O., 2010. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industr - A review. *Braz. J. Microbiol.* 41:850-861.
- Sudha, 2012. Effect of different concentrations of metal ions on alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Research in Biotechnology*, 3(4): 67-71.
- Szilagyi, A., Ad Zavodszky, P. 2000. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results on a comprehensive survey. *Structure*. 8:493-504.
- Syu, M., Chen, Y.H., 1997. A study on the  $\alpha$ -amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chemical Engineering journal*. 65, 237-247.
- Şimşek, T., 2006. "Türkiye'nin Değişik Bölgelerinden Termotabil Alfa Amilaz Üreten *Bacillus* sp. Türlerinin İzolasyonu Karakterizasyonu ve Alfa Amilaz Geninin Klonlanması". Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Takasaki, Y., Frutanl S., Iayashi, S., and Imada, K., 1994. Acid-Stable and Thermostable a-Amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77 (1): 94-96.
- Taniguchi, A., and Honnda, Y., 2009. Amylases, *Applied Microbiology: Industrial*, 159-173.

- Tatar, S., 2007. Termofil Moderately Halofilik *Bacillus* sp. Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Tekinşen, O., Atasever, M., Keleş, A., Tekinşen, K., 2002. Süt, Yoğurt, Tereyağı, Peynir Üretim Kontrolü, 2.Baskı. Konya Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, İst.345s.
- Teodoro, C.E.S., Martins, M.L.L., 2000. Culture Conditions For The Production Of Thermostable Amylase By *Bacillus* Sp. Braz. J. Microbiol. vol.31 no.4
- Thieme, F., Engler, C., Kandzia, R., Marillonnet, S., 2011. "Quick and clean cloning: a ligation-independent cloning strategy for selective cloning of specific PCR products from non-specific mixes", 6 (6), 1-12.
- Tortoli, E., 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin. Microbiol. Rev., 16: 319–354.
- Ueda M., Asano T., Nakazawa M., Miyateke K., Inouye K., 2008. Purification and characterization of novel raw starch digesting and cold adapted  $\alpha$ -amylase from *Eisenia foetida*, Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 150, 125-130.
- Van Der Maarel, M.J.E.C., Van Der Veen, B., Uidehaag, J.C.M., Leembius, H., Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. Journal of Biotechnology. 94, 137-155.
- Vengadaramana, A., Balakumar, S., Vasanthi, A., 2012. Production and Optimization of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus licheniformis* ATCC 6346 in Lab Bench-Scale Fermenter. J. Microbiol. Biotech, 2(1): 190-211.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). Methods in Molecular and Cellular Biology. 5, 25–40.
- Wanderley, K.J., Torres, F.A.G., Moraes, L.M.P., Ulhoa, C.J., 2004. Biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. FEMS Microbiology Letters 231:165-169.
- Wang, Y., W., Nema, S., Teagarden, D., 2010. "Protein aggregation Pathways and influencing factors", International Journal of Pharmaceutics, 390 (2), 89-99.
- Wilson, K., and Goulding, K.H., 1986. A Biologist's Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Edward Arnold, London.396s.
- Yandri, Suhartati, T. ve Hadi, Sutopo., 2010. Purification and Characterization of Extracellular  $\alpha$ -amylase Enzyme from Local Bacteria Isolate *Bacillus Subtilis* ITBCCB148. European Journal of Scientific Research, 39, 64-74.
- Yang, S.J., Lee, H.S, Park, C.S, Kim, Y.R, Moon, T.W, Park, K.H., 2004. "Enzymatic Analysis of an Amylolytic Enzyme from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* Reveals Its Novel Catalytic Properties as both an  $\alpha$ -Amylase and a Cyclodextrin-Hydrolyzing Enzyme", Applied and Environmental Microbiology, 70, 5988–5995.
- Zeikus, J.G., 1979. Enzyme Microb. Technol. 3,243.
- Zhou, M.Y., Gomez-Sanchez, C.E., 2000. "Universal TA cloning", Current Issues in Molecular Biology, 2 (1), 1-7.
- Zihnioğlu, F., 1996. Protein saflaştırması ve karakterizasyonu elektroforetik yöntemler, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme İzmir, 150.

## ÖZGEÇMİŞ

10.03.1992 yılında Aksaray’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Aksaray’da tamamladı. 2010 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden 2015 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

