



SİNOP İLİ TOPRAK VE SU ÖRNEKLERİNDEN
İZOLE EDİLEN *BACILLUS* TÜRLERİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE
BAZI ENZİM AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ
HİLAL KOYUNCU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİNOP İLİ TOPRAK VE SU ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *BACILLUS*
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE
BAZI ENZİM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

HİLAL KOYUNCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. HÜLYA SİPAHİ

SİNOP – 2016

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Hilal KOYUNCU, tarafından hazırlanan “Sinop İli Toprak ve Su Örneklerinden İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Bazı Enzim aktivitelerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, 29.07.2016 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.


Doç.Dr. TUBA YILDIRIM
Jüri Başkanı


Yrd.Doç.Dr. HÜLYA SİPAHİ
Jüri Üyesi


Yrd.Doç.Dr. ELİF TEZEL ERSANLI
Jüri Üyesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.


Doç.Dr. TURGAY KORKUT
Enstitü Müdürü

SİNOP İLİ TOPRAK VE SU ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN BACILLUS TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE BAZI ENZİM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Enzim üretme yeteneğine sahip olan bakteriler, doğada organik madde ayrışmasında ve besin döngüsünde önemli rol oynarlar. Özellikle fazla miktarda ekstrasellüler enzim üreten ve salgılayan *Bacillus* suşları en önemli endüstriyel enzim üreticileri arasında yer alır. Çalışmada; Sinop ilinin farklı bölgelerinden toplanan toprak ve su örneklerinden izole edilen 126 *Bacillus* spp. morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlere göre tanımlanmıştır. Ayrıca tüm *Bacillus* spp.'lerin amilaz, selüloz ve proteaz aktiviteleri belirlenmiştir. 126 suştan 54'ünde enzim aktivite göstermiştir ve bu suşların SDS-PAGE toplam hücre protein profilleri ve plazmid DNA profilleri tespit edilmiştir.

SDS-PAGE hücre içi toplam protein profillerine göre, 54 *Bacillus* suşu %63 ve üzerindeki benzerlikle iki ana gruba ayrılmıştır. 54 *Bacillus* spp. suşun 41 inde moleküler ağırlıkları 2.156 bç ile 20.678 bç arasında değişen plazmid varlığı belirlenmiştir. Amilaz, selüloz ve proteaz enzimlerinin her biri için aktiviteleri en yüksek olan birer suş saptanmıştır. Bu suşların en iyi enzim üretimi için optimum sıcaklık ve pH koşulları belirlenip, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca suşların enzim üretme koşullarında farklı konsantrasyonlarda NaCl ve çeşitli kimyasalların etkisi saptanmıştır. Optimum enzim aktiviteleri; amilaz için 40°C ve pH:8.0; selüloz için 60°C ve pH:10.5 ve proteaz için 40°C ve pH:8.0 olarak belirlenmiştir. Tüm Enzimler 60 dakika ön-inkübasyonda %3 NaCl varlığında en yüksek aktiviteyi göstermiştir. %3-20 tuz konsantrasyonları arasında amilaz, selüloz, proteaz sırasıyla %62,86; %79,79; %82,19 oranında kalan enzim aktivitesi ile stabil kalmıştır. MnCl₂ varlığında, amilaz, selüloz ve proteaz sırasıyla %101,06; %148,83 ve %109,09 oranında en yüksek kalan enzim aktivitesi göstermiştir. CaCl₂ iyonları; amilaz, selüloz ve proteaz enzimlerinin en yüksek kalan enzim aktivitelerinde %138,29; %151,16 ve %113,63 oranında rol oynamıştır. Diğer yandan enzimler çeşitli deterjanlara, inhibitörlere, metal iyonlarına ve şelatörlere karşı direnç göstermiştir. Zimogram analizleri sonucunda amilazın 120 kDa, selülozın 64 kDa ve

proteazın 51 kDa moleküler ağırlığında tek bir bant verdiği tespit edilmiştir. İnce tabaka kromatografisi yöntemiyle amilaz ve selülazın hidroliz ürünlerinin maltoz ve maltoz kökenli oligosakkaritler olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, araştırılan yüksek stabiliteli bu enzimler; çeşitli deterjanlara, inhibitörlere, metal iyonlarına ve şelatörlere karşı dirençli olmasından dolayı deterjan üretimi, biracılık, fırıncılık ve tekstil gibi birçok endüstriyel alanda kullanım potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* spp., Toprak, Su, SDS-PAGE, Selülaz, Proteaz, Amilaz



DETERMINATION OF SOME ENZYMES ACTIVITIES AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *BACILLUS* SPECIES ISOLATED FROM SOIL AND WATER SAMPLES IN SINOP REGION

ABSTRACT

Bacteria are capable of producing enzymes that play an important role in organic matter decomposition and nutrient cycling. Especially, *Bacillus* strains with ability to produce and secrete large quantities of extracellular enzymes constitute the most important industrial enzyme producers. In the study; a total of 126 *Bacillus* spp. isolated from soil and water samples collected from different regions in Sinop were identified according to morphological, physiological and biochemical tests. The activities of amylase, cellulase and protease were determined from all the characterized *Bacillus* spp. isolates. From a total of 126 strains, 54 isolates displayed enzyme activity and SDS-PAGE total cell protein and plasmid DNA profiles of these isolates were also determined.

The numerical analysis of SDS-PAGE whole cell protein profiles revealed that *Bacillus* strains were separated to 2 major groups at similarity levels 63% or above. Plasmid DNA analyses results confirmed that total of 54 *Bacillus* spp. strains 41 in a harbored plasmids with molecular weights changing between 2.156 to 20.678 bps. For each of amylase, cellulase and protease enzymes, one strain with the highest activities was determined. Partial purification and characterization of the enzymes were carried out by determining the optimum temperature and pH conditions of these strains for the best enzyme production. Besides, the effects of different chemicals and NaCl concentrations on the enzyme activity were determined. The maximum enzymes activities were obtained at 40°C and pH:8.0 for amylase, at 60°C and pH 10.5 for cellulase and at 40°C and pH:8.0 for protease. All the enzymes showed maximum activity in presence of %3 NaCl with 60 minutes pre-incubation. At the %3-20 salt concentrations, amylase, cellulase and protease were stabile with the remaining activities of 62.86%; 79.79%; 82.19% respectively. In the presence of MnCl₂, amylase, cellulase and protease had the highest remaining activity about 101.06%; 148.83% and 109.09%, respectively. In addition, CaCl₂ ions displayed the highest remaining

activities of amylase, cellulose and protease with 138.29%; 151.16%; 113.63%, respectively. On the other hand, the enzymes showed resistance against various detergents, inhibitor, metal ions, chelators. The molecular weight of the enzymes were determined to be 120 kDa for amylase, 64 kDa for cellulose and 51 kDa for protease as a single band, by zymogram analyses. Maltose and maltose-derived oligosaccharides were determined as hydrolysis products of amylase and cellulose by thin layer chromatography.

As a result, the investigated enzymes with high stability have the potential of use in many industrial fields such as detergent production, brewing, bakery, and textile since they are resistant to various detergents, inhibitor, metal ions, and chelators.

Key Words: *Bacillus* spp., Soil, Water, SDS-PAGE, Cellulase, Protease, Amylase

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimimde ilgisini, emeğini ve desteğini hiç esirgemeyen bilimsel titizliği ve çalışma disiplini örnek aldığım değerli ve rahmetli hocam Prof. Dr. İsmet BERBER'e

Tez çalışmamın tamamlanmasında bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren değerli tez danışmanım, Yrd. Doç. Dr. Hülya SİPAHİ'ye

Laboratuvar ve tez yazım çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, dostluk ve yardımlarını gördüğüm, Arş. Gör. Cumhur AVŞAR'a, Seyhan CİVEK'e ve Nur ÖNAL'a

Beni bugünlere getiren, üzerimde büyük emekleri olan, her sıkıntıda yanımda olacaklarını bilmenin güvenini her zaman hissettiren ve her konuda daima bana destek olan babam Halil KOYUNCU ve annem Necibe KOYUNCU'ya sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Bacillus</i> Cinsi Hakkında Genel Bilgiler	3
2.1.1. <i>Bacillus subtilis</i>	3
2.1.2. <i>Bacillus cereus</i>	4
2.1.3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2.2. <i>Bacillus</i> Türlerinin Tanımlanmasında Kullanılan Metotlar	5
2.3. Enzimler ve Bazı Özellikleri	7
2.3.1. Nişasta, Amilazlar ve Amilazların Kullanım Alanları	7
2.3.2. Selüloz, Selülazlar ve Kullanım Alanları	9
2.3.3. Proteaz ve Kullanım Alanları	9
2.4. Enzim Saflaştırma Yöntemleri	10
2.5. Enzimlerle ilgili Yapılan Çalışmalar	12
3. MATERYAL ve METOT	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Örneklerin Toplanması	14
3.2. Metot	16
3.2.1. <i>Bacillus</i> spp. Suşlarının İzolasyonu	16
3.2.2. İzolatların Teşhisi	17
3.2.2.1. Gram Boyama	17
3.2.2.2. Endospor Boyama	18
3.2.2.3. Katalaz Testi	18
3.2.2.4. Jelatin Hidrolizi	18

3.2.2.5. Nitrat Redüksiyon Testi	18
3.2.2.6. Voges-Proskauer Testi	19
3.2.2.7. H ₂ S Testi	19
3.2.2.8. Tuz Tolerans Testi	19
3.2.2.9. Sıcaklık Tolerans Testi	19
3.2.2.10. pH Tolerans Testi	20
3.2.2.11. Karbonhidrat Fermantasyon Testi	20
3.2.2.12. SDS-PAGE Analizi	20
3.2.2.13. Plazmid Analizi	21
3.2.2.14. Genomik DNA Analizi	21
3.2.2.15. Agaroz Jel Elektroforez	22
3.2.2.16. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	22
3.2.2.17. 16S rRNA için Agaroz Jel Elektroforezi	23
3.2.2.18. Plazmid ve Protein Profillerinin İstatistiksel Analizi	24
3.2.2.19. 16S rRNA İstatistiksel Analizleri	24
3.2.3. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	24
3.2.3.1. Katı Besi Yerinde Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi	24
3.2.3.2. Katı Besi Yerinde Selülaz Aktivitesinin Belirlenmesi	25
3.2.3.3. Katı Besi Yerinde Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi	25
3.2.3.4. <i>Bacillus</i> Suşlarının Katı Besi Yerinde Ürettiği ve Enzim Sentezlerinin Gerçekleştiği Sıcaklık ve pH Aralığının Saptanması	25
3.2.3.5. Optimum Üreme ve Enzim Prodüksiyonu İçin Gerekli Tuz Konsantrasyonlarının Saptanması	26
3.2.3.6. Sıvı Kültürde Amilaz Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırılması	26
3.2.3.7. Sıvı Kültürde Selülaz ve Proteaz Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma	26
3.2.3.8. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması	27
3.2.3.9. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanması	27
3.2.3.10. Enzimlerin Sıcaklık Stabilesinin Saptanması	27
3.2.3.11. Enzimlerin pH Stabilesinin Saptanması	28
3.2.3.12. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Enzim Aktiviteleri Üzerine	28

Etkilerinin Saptanması	
3.2.3.13. İnhibitörlerin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri	29
3.2.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (PAGE) Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi	29
3.2.4.1. SDS-PAGE Sisteminin Hazırlanması	29
3.2.4.2. Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi	30
3.2.4.3. Zimogram Analizi için SDS-PAGE Sisteminin Hazırlanması	30
3.2.4.4. Amilaz Enzimi Zimogram Analizi İçin Doğal (Native) Jelin Hazırlanması	30
3.2.4.5. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram Analizleri	30
3.2.5. Enzim Substrat Reaksiyonu Sonunda Açığa Çıkan Son Ürünlerin Saptanması	31
3.2.5.1. Amilaz Enzimine Ait Son Ürünlerin Saptanması	32
3.2.5.2. Selüloz Enzimine Ait Son Ürünlerin Saptanması	32
4. BULGULAR	33
4.1. <i>Bacillus</i> spp. İzolatlarının Biyokimyasal Test Sonuçları	33
4.2. <i>Bacillus</i> Suşları SDS-PAGE Bulguları	39
4.3. <i>Bacillus</i> Suşlarının Plazmid DNA Analizi Sonuçları	41
4.4. 16S rRNA Dizi Analiz Sonuçları	41
4.5. Amilaz Enzimi İçin Belirlenen Suşların Farklı pH ve Sıcaklık Değerlerinde Üremesi ve Enzim Üretme Sonuçları	44
4.5.1. M9 Nişastalı Agar Besi Yerinde Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Bakteri Üreme Yeteneği ve Enzim Sentezine Ait Sonuçlar	46
4.6. Selüloz Enzimi İçin Belirlenen Suşların Farklı pH ve Sıcaklık Değerlerinde Üremesi ve Enzim Üretme Sonuçları	47
4.6.1. CMC-Agar Besi Yerinde Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Bakteri Üreme Yeteneği ve Enzim Sentezine Ait Sonuçlar	52
4.7. Proteaz Enzimi İçin Belirlenen Suşların Farklı pH ve Sıcaklık Değerlerinde Üremesi ve Enzim Üretme Sonuçları	53
4.7.1. Skimmilk-Agar Besi Yerinde Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Bakteri Üreme Yeteneği ve Enzim Sentezine Ait Sonuçlar	54
4.8. 4 Numaralı Suştan Saflaştırılan Amilaz Enziminin Optimum pH Aralığı	55

4.8.1. 4 Numaralı Suştan Saflaştırılan Amilaz Enziminin Optimum Sıcaklık Aktivitesi	56
4.8.2. 4 Numaralı Suşun Amilaz Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi	57
4.8.3. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enziminin Termal Stabilitesine Ait Bulgular	58
4.8.4. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enzim Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisi	59
4.8.5. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enzimi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi	60
4.8.6. 4 Numaralı Suşun SDS-PAGE ve Zimogram Analizi	61
4.8.7. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enzimine Ait İnce Tabaka Kromatografi Bulguları	61
4.9. 12 Numaralı <i>Bacillus</i> sp. Suşunun Selüloz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerine Ait Sonuçlar	62
4.9.1. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerine Ait Sonuçlar	63
4.9.2. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin pH Stabilitesine Ait Sonuçları	64
4.9.3. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin Termal Stabilitesine Ait Sonuçları	65
4.9.4. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enzim Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisi	66
4.9.5. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Oksidanların Etkisi	67
4.9.6. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin SDS-PAGE ve Zimogram Analizi	68
4.9.7. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enzimine Ait İnce Tabaka Kromatografi Bulguları	68
4.10. 9 Numaralı <i>Bacillus</i> sp. Suşunun Proteaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerine Ait Sonuçlar	69
4.10.1. 9 Numaralı Suşun Proteaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerine Ait Sonuçlar	70
4.10.2. 9 Numaralı Proteaz Enziminin pH Stabilitesine Ait Bulgular	71
4.10.3. 9 Numaralı Proteaz Enziminin Termal Stabilitesine Ait Bulgular	72
4.10.4. 9 Numaralı Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisi	73
4.10.5. 9 Numaralı Proteaz Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Metal	74

İyonu, Deterjan ve Oksidanların Etkisi	
4.10.6. 9 Numaralı Proteaz Enziminin SDS-PAGE ve Zimogram Analiz Sonuçları	75
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	76
6. KAYNAKÇA	86
7. EKLER	100
EK-1 Suşların Tanısında Kullanılan Besiyerleri	100
EK-2 Araştırmada Kullanılan Boya ve Diğer Çözeltiler	102
EK-3 Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	104
EK-4 Plazmid Analizinde Kullanılan Tampon Çözeltiler	108
EK-5 Genomik DNA Analizinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	110
EK-6 Kullanılan Cihazlar	112
EK-7 Enzimler İle İlgili Tampon, Çözelti, Boya ve Solüsyonlar	113
EK-8 16S rRNA Dizi Analizi	118
8. ÖZGEÇMİŞ	120

SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ

AMPS	Amonium Per Sulfate
CMC	Karboksimetilselüloz
CMCaz	Karboksimetilselülaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNS	Dinitrosalisilikasit
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamase
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
rpm	Dakikada devir sayısı
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TAE	Tris-Asetik Asit-Edta
TBE	Tris Borate EDTA
TCA	Trikloro Asetik Asit
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetrametil etilendiamin
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
UPGMA	Unweight Pair Group Method Algorithm
VP	Voges-Proskauer
α	Alfa
β	Beta
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
bp	Baz çifti
dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilodalton

km ²	Kilometrekare
l	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
sn	Saniye



ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER LİSTESİ

ŞEKİLLER

	Sayfa no
Şekil 3.1. Örnekleme İstasyonları	15
Şekil 4.1. Amilaz, Selüloz ve Proteaz Aktivitesine Sahip <i>Bacillus</i> spp. Suş Adetleri	33
Şekil 4.2. Farklı NaCl Konsantrasyonlarında Gelişme Gösteren <i>Bacillus</i> İzolatlarının Oranları	34
Şekil 4.3. Farklı pH'larda Gelişme Gösteren <i>Bacillus</i> İzolatlarının Oranları	34
Şekil 4.4. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Gösteren <i>Bacillus</i> İzolatlarının Oranları	34
Şekil 4.5. Toprakтан İzole Edilen <i>Bacillus</i> spp. SDS-PAGE Toplam Hücre Protein Profilleri	40
Şekil 4.6. Sudan İzole Edilen <i>Bacillus</i> spp. SDS-PAGE Toplam Hücre Protein Profilleri	40
Şekil 4.7. <i>Bacillus</i> spp. Plazmid DNA Profilleri	41
Şekil 4.8. <i>Bacillus</i> spp. 16S rRNA Jel Görüntüsü	42
Şekil 4.9. Maksimum Likelihood (olasılık) Metodu ile Moleküler Filogenetik Analiz	42
Şekil 4.10. Toprak ve Su Örneklerinden İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının Toplam Hücre Protein Profilleri Dendrogramı	43
Şekil 4.11. Amilaz Enziminin %3 NaCl İçeren Ortamda Gelişimi	47
Şekil 4.12. Selüloz Enziminin pH:8'de %3-10 Tuz Oranlarında Oluşturduğu Zon Çapları	52
Şekil 4.13. Skimmilk-Agarda Suşların Zon Görünümleri	54
Şekil 4.14. 4 Numaralı Suştan Elde Edilen Amilaz Enziminin Optimum Ph'sı	55
Şekil 4.15. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerleri	56
Şekil 4.16. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enziminin pH Stabilitesi	57
Şekil 4.17. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enziminin Termal Stabilitesi	58

Şekil 4.18.	4 Numaralı Suşun Amilaz Enzim Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisi	59
Şekil 4.19.	Enzim Üzerine İnhibitörlerin Etkisi	60
Şekil 4.20.	<i>Bacillus</i> sp. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enziminin Moleküler Ağırlığı ve Zimogram Analizi	61
Şekil 4.21.	<i>Bacillus</i> sp. 4 Suşunun Amilaz Enziminin İnce Tabaka Kromatografisi İle Son Ürünlerinin Belirlenmesi	61
Şekil 4.22.	12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerine Ait Sonuçlar	62
Şekil 4.23.	12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin Optimum Aktivite Sıcaklık Verileri	63
Şekil 4.24.	12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin pH Stabilite Verileri	64
Şekil 4.25.	12 Numaralı Selüloz Enziminin Termal Stabilite Verileri	65
Şekil 4.26.	12 Numaralı Enzim Aktivitesine Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Etkisi	66
Şekil 4.27.	12 Numaralı Selüloz Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Oksidanların Etkisi	67
Şekil 4.28.	<i>Bacillus</i> sp. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin Moleküler Ağırlığı ve Zimogram Analizi	68
Şekil 4.29.	<i>Bacillus</i> sp. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin İnce Tabaka Kromatografisi İle Son Ürünlerinin Belirlenmesi	68
Şekil 4.30.	9 Numaralı Suşun Proteaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerine Ait Sonuçlar	69
Şekil 4.31.	9 Numaralı Proteaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değerine Ait Sonuçlar	70
Şekil 4.32.	9 Numaralı Proteaz Enziminin pH Stabilite Değerleri	71
Şekil 4.33.	9 Numaralı Proteaz Enziminin Termal Stabilitesine Ait Bulgular	72
Şekil 4.34.	9 Numaralı Proteaz Aktivitesi Üzerine Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi	73
Şekil 4.35.	9 Numaralı Proteaz Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Oksidanların Etkisi	74
Şekil 4.36.	<i>Bacillus</i> sp. 9 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin Moleküler Ağırlığı ve Zimogram Analizi	75

ÇİZELGELER

		Sayfa no
Çizelge 3.1.	Su Örneklerinin Alındığı İstasyonlar ve Suşların Sembolik Gösterimi	15
Çizelge 3.2.	Toprak Örneklerinin Alındığı İstasyonlar ve Suşların Sembolik Gösterimi	16
Çizelge 3.3.	PZR Analizinde Kullanılan Primerlere Ait Bilgiler	22
Çizelge 3.4.	PZR Reaksiyon Karışımı	23
Çizelge 3.5.	PZR Koşulları	23
Çizelge 4.1.	Toprak Kökenli <i>Bacillus</i> Suşlarının Biyokimyasal Test Sonuçları	35
Çizelge 4.2.	Su Kökenli <i>Bacillus</i> Suşlarının Biyokimyasal Test Sonuçları	36
Çizelge 4.3.	Su Kökenli <i>Bacillus</i> Suşlarının Sıcaklık Test Sonuçları	36
Çizelge 4.4.	Toprak Kökenli <i>Bacillus</i> Suşlarının Sıcaklık Test Sonuçları	37
Çizelge 4.5.	Toprak Kökenli <i>Bacillus</i> Suşlarının Karbonhidrat Fermantasyon Sonuçları	38
Çizelge 4.6.	Su Kökenli <i>Bacillus</i> Suşlarının Karbonhidrat Fermantasyon Test Sonuçları	39
Çizelge 4.7.	Toprak ve Su Kökenli Suşların Farklı Sıcaklık ve pH Değerlerinde Amilaz Üretimine Ait Sonuçlar	44
Çizelge 4.8.	4 Numaralı Suşun Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Üreme ve Enzim Sentezine Ait Sonuçlar	46
Çizelge 4.9.	Toprak ve Su Kökenli Suşların Farklı Sıcaklık ve pH Değerlerinde Selülaz Üretimine Ait Sonuçlar	48
Çizelge 4.10.	12 Numaralı Suşun Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Üreme ve Enzim Sentezine Ait Sonuçlar	52
Çizelge 4.11.	Toprak ve Su Kökenli Suşların Farklı Sıcaklık ve pH Değerlerinde Proteaz Üretimine Ait Sonuçlar	53
Çizelge 4.12.	9 Numaralı Suşun Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Üreme ve Enzim Sentezine Ait Sonuçlar	54

1. GİRİŞ

Enzimler hücredeki metabolik faaliyetlerin tümünü yöneten özel katalizatörlerdir. Organik kimyanın alışılmış metotları ile gerçekleştirilmesi çok güç olan birçok reaksiyonun uygun ve spesifik enzimler sayesinde kolaylıkla başarılması enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için kullanılması fikrini ortaya çıkarmıştır. Enzimatik işlemlerin geleneksel işlemlere oranla daha az miktarda atık oluşturarak daha az çevre kirliliğine yol açması, daha uygun koşullarda ekonomik olarak gerçekleştirilmesi endüstriyel alanlarda enzim kullanımını daha cazip hale getirmektedir (Coşkun, 2010).

Günümüzde endüstriyel enzimler çok farklı kaynaklardan elde edilebilmektedir. Bunlar; bitkisel kaynaklı enzimler, hayvansal kaynaklı enzimler ya da çağımız teknolojileriyle endüstriyel bakımdan ihtiyacı karşılayabilen mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir (Karcıoğlu, 2011). Bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamaması bu alandaki ilginin giderek artan bir şekilde mikrobiyal kaynaklı enzimlere yönelmesini sağlamıştır. Mikroorganizmaların biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyonlara uygunlukları da bunların enzim olarak değerlendirilmesinde büyük etkindir (Rao ve ark., 1998; Aygan, 2008). Mikroorganizmaların mükemmel bir enzim kaynağı olarak tercih edilmesinin nedenleri; enzim üretme aktivitelerinin yüksek olması, diğer enzim kaynaklarına kıyasla daha az yan ürün oluşturmaları, daha stabil ve ucuz olmaları, istenilen boyutlarda ve yüksek saflıkta üretilebilmeleridir (Kıran ve Çömlekçioğlu 2003). Ayrıca mikroorganizmalar seçilirken sadece enzim üretme yeteneklerine göre değil, aynı zamanda toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmedir (Demain ve Solomon, 1981).

Mikrobiyal kaynaklı enzimler gıda, tekstil ve deterjan endüstrilerinde geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir. Endüstriyel önemlerinden dolayı uygun enzimleri üreten yeni bakteriyel suşların izolasyonuna olan ilgi de artmaktadır (Ghorbel ve ark., 2009).

Doğada özellikle bazı *Bacillus* türleri endüstriyel ve ekonomik öneme sahip birçok enzimi sentezlemektedirler. Gram-pozitif olan *Bacillus* cinsi bakterilerin çoğu zararsız, izolasyonu ve teşhisi kolay, hızlı büyüme oranı ile fermantasyon süresi kısa, genel olarak güvenli olması, sentezledikleri proteinleri dış ortama salgılama kapasiteleri gibi birçok sebepten ötürü cazip endüstriyel organizmalardır. Oysaki gram negatif

bakteriler sentezledikleri proteinleri periplazmik boşluklarında ya da protoplazmalarında biriktirirler. Bu da üretilen ürünün izolasyonunu güçleştirerek suştan birden fazla kez yararlanılmasını engeller. Ayrıca gram negatif bakteriler, insanlara toksik olan endotoksin üretimi ve intrasellüler protein üretimi ile izolasyon ve saflaştırma aşamalarında ekstra maliyet oluşturmaktadır (Schallmey ve ark. 2004). Mantarlardaki aflotoksin gibi toksik ya da alerjen bileşik üretimi de dikkate alındığında, gram pozitif bakterilerin, özellikle *Bacillus* türlerinin endüstriyel enzim üretiminde öncelikli olarak tercih edilmesini sağlamıştır.

Bu çalışmada Sinop ili toprak ve su örneklerinden *Bacillus* türlerinin tespit edilmesi, izole edilen türlerin enzim üretme yeteneklerinin belirlenmesi ve enzim üretme yeteneği yüksek olan suşların 16S rRNA dizi analizine göre tanımlanması amaçlanmaktadır.

Elde edilen veriler doğrultusunda kısmi olarak saflaştırılan enzimlerin çeşitli endüstriyel alanlarda kullanım olanağı bulacağı ve dış ülkelere satın alınan bazı enzimlerin ülkemizde geniş çapta üretilmesi ve böylece ülke ekonomisine katkıda bulunulması mümkün olabilecektir. Ayrıca enzim aktivitesi yüksek olarak seçilen mikroorganizmanın insan sağlığına etkilerinin araştırılması ile GRAS (Generally Recognized as Safe) mikroorganizma olduğu saptanırsa, elde edilen enzimlerin gıda sanayisinde de kullanılması önem kazanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Bacillus* Cinsi Hakkında Genel Bilgiler

Bacillus türleri; Gram-pozitif, çomak şekilli, endospor oluşturma yeteneğine sahip, aerob veya fakültatif anaerob şartlarda üreyebilen mikroorganizmalardır. Tek ya da çok sayıda hücrelerden oluşan uzun zincirler meydana getirebilirler. Hücrede bulunan sporun şekli ve yeri, *Bacillus* türlerinde karakteristik bir özellik gösterir. Bu cinse ait endosporlar genellikle elipsoidal, silindirik, oval ya da yuvarlaktır. Sporun hücre üzerindeki konumu ise merkezde, merkeze yakın veya uçta bulunabilir (Lennette ve ark., 1985).

Habitatları toprak olmasına rağmen doğada hava, su ve yiyecek gibi birçok ortamda yaşayabilen *Bacillus* türleri; antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi özellikleri ve kolay üretilmeleri nedeni ile bakteriler arasında dikkat çeken mikroorganizmalardır. Birçok biyoteknolojik çalışmada kullanılan *Bacillus*'lar ürettikleri proteinler nedeniyle ticari öneme sahiptirler. *Bacillus* türleri çok çeşitli metabolik özelliklerinin yanı sıra geniş fizyolojik yetenekleri ile psikrofilikten termofiliğe, asidofilikten alkalifiliğe, halotoleranttan halofiliğe kadar geniş bir yelpazeye sahiptirler. Bu nedenle endüstriyel uygulamalarda kullanılma potansiyelleri daha yüksektir (Haliskaranfil, 2012).

2.1.1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis türünün tüm genomu dünyada 33 farklı laboratuvar tarafından iş birliği yapılarak 1997 yılında tamamlanıp yayınlanmıştır. Bu türün genomu fonksiyonu bilinmeyen 25 gen olmak üzere 275 genden, 17 sigma faktöründen, 4106 protein kodlayan genlerden, 86 tRNA, 30 rRNA ve 3 küçük stabil RNA genlerinden oluşmaktadır. (Kunst ve ark., 1997). *B. subtilis* hastalık yapmayan, hareketli, gram pozitif, endospor oluşturabilme yeteneğine sahip çubuk şekilli mikroorganizmalardır. Kemoorganotrof olan bu bakteri türü sadece tuz, karbon ve nitrojen içeren çok basit gelişme koşullarında hayatta kalabilmektedir (Nicholson ve ark., 1990). Ayrıca, *B. subtilis* sporulasyondan sorumlu genleri harekete geçirerek çeşitli sınırlayıcı ortamlara adapte olarak gelişimini sürdürebilmektedir (Vlamakis ve ark., 2013). Bu bakteriler sınırlı besin kaynaklarında beslenme yetersizliğine karşı enzimleri parçalayan hücre dışı makromolekülleri üretebilme yeteneğine sahiptir. Rakiplerinden korunmak amacıyla

basilisin adı verilen peptid antibiyotikleri gibi çeşitli antibiyotikleri de salgırlar (Msadek, 1999).

2.1.2. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus, *Bacillaceae* familyasının *Bacillus* cinsine ait bir bakteri olup toprak ve bitki örtüsü üzerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Kalkan ve Halkman 2006). Patojen olan bu tür bozulmuş gıda ürünlerinde de bulunmaktadır (Drean ve ark., 2015). Optimum sıcaklık aralığı 28-35°C arasında değişmekle beraber genellikle 30°C'dir. Gelişme gösterdiği pH aralığı ise 4.9-9.3 olup pH:7.0'de en iyi aktiviteyi göstermektedir. *B. cereus* iki toksin üretmektedir. Birincisi 40 kDa ağırlığındaki sıcaklığa dayanıklı bir protein olan enterotoksin (stabil toksin; ST) ikincisi ise 5-7 kDa ağırlığındaki ısıya duyarlı bir peptittir (labil toksin; LT). Gıda zehirlenmesine neden olan bu toksinler sırasıyla 126°C'de 90 dakikada ve 60°C'de birkaç dakikada tahrip olurlar (Güney, 2014; Kalkan, 2006).

2.1.3. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis, gram pozitif, endospor oluşturan, fakültatif anaerob gelişme gösteren toprak kökenli bir mikroorganizmadır. Bu türün insektisidal aktivite gösteren (böcek öldürücü) protein yapısındaki parasporal kristalleri ürettiği bilinmektedir. *B. thuringiensis* suşlarının aktivitesinin ve biyokimyasal yapısının suştan suşa değişebileceği 3 farklı toksini sentezleyebildiği bulunmuştur: alfa ekzotoksin, beta ekzotoksin ve delta endotoksin (Yişil, 2014). Çok sayıda ve farklı büyüklüklerde plazmidlere sahip olan bu türün delta endotoksin genlerinin çoğu da bu plazmidler üzerinde bulunurken bazıları da kromozom üzerinde yer almaktadır. *B. thuringiensis* karakterizasyonunda plazmid sayısının belirlenmesi, bu plazmidlerin *cry* genlerini taşıyıp taşımadığının tespit edilmesi önemlidir. Ayrıca H-serotiplendirme de izolatların sınıflandırılmasında kullanılan faydalı bir yöntemdir (Azizoğlu, 2014).

2.2. *Bacillus* Türlerinin Tanımlanmasında Kullanılan Metotlar

Bakteriler fenotipik ve genotipik olarak iki kategoride tiplendirilmektedirler.

Fenotipleme; serotip, bakteriyosin, bakteriyofaj tipleme ve antibiyotik dirençliliğini içermektedir. Suşların tanımlanmasında ve tiplendirilmesinde kullanılan en eski yöntemlerden biri; biyotiplendirme. Biyotiplendirme; bir organizmanın izolasyonu, pH, sıcaklık gibi ekstrem çevre şartlarına uyumu, seçici besi yeri ortamında gelişimi, koloni morfolojisi ve spesifik biyokimyasal reaksiyonları kapsamaktadır. Bu tekniğin kullanımı klasik taksonomide temel kriter olmuştur (Zaidi ve ark., 2003). Ancak, bu yöntem kullanışlı olmasına rağmen türler arası varyasyonların belirlenmesinde ve tekrarlanabilirliğinde bazı dezavantajları da bulunmaktadır.

Genotipleme ise protein profilleri, plazmid ve kromozomal DNA'ya dayalı analizlere dayanmaktadır. Plazmidler; ekstrakromozomal, replike olabilen, küçük, halkasal çift iplikli DNA molekülleridir. Alkali lizis prosedürlerini kullanan geleneksel plazmid izolasyonu ve çok sayıda türetilmiş yöntemlerin kullanılması plazmid izolasyonunun mikrobiyolojide ve moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır. Bu durum plazmid profillerini bakteriyal tanımlamaya yardımcı analizler haline getirmiştir. Ancak suşların yaşamları boyunca kazandıkları ve kaybettikleri plazmid, yöntemin güvenilirliğini etkilemektedir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011). Aslim ve Beyatlı (2004), yoğurttan izole ettikleri 34 *Streptococcus thermophilus* suşlarının plazmid DNA içeriklerini araştırarak 7 suşun plazmid DNA içermediği, diğer suşlarda 1 ve 5 arasında moleküler ağırlıkları 1,88-19,89 kb arasında plazmid varlığını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Delgado ve Mayo, (2004) ve Mourad, (2007) tür içi ve türler arası genetik madde aktarımından sorumlu olan plazmidlerin bakterilere çevresel uyumu kolaylaştıracak genetik esneklik kazandırdıkları, suşların plazmid içeriklerinin ve kodladıkları özelliklerin tanımlanmasının endüstriyel öneme sahip özelliklerin moleküler düzeyde belirlenmesi bakımından önem taşıdığını bildirmişlerdir.

Bakteri sınıflandırma çalışmalarında protein profillerinin kullanım olanakları uzun zamandır araştırılmaktadır. Bu konuda yapılan ilk çalışmalar toplam protein profillerinin tespitine dayanmaktadır. Tüm hücre proteinlerinin hareketli bir fazda elektrik akımı altında moleküler ağırlıklarına göre göç ettirilerek proteinlerin ayrışmasını sağlayan sodyum dodesil poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi sıkça kullanılmaktadır. Bu yöntemle çok sayıda hızla tarandığı tür ve/veya tür altı düzeyde güvenilir sonuçlar elde edildiğini bildirmişlerdir (Berber ve Berber, 2006;

Berber ve Ekin, 2008). Reddy ve ark. (2012), et örneklerinden izole ettikleri *E. coli* suşlarının plazmid içeriğini, antibiyotik dirençliliklerini belirleyerek hücre protein profillerini SDS-PAGE metoduyla tespit etmişlerdir. Ayrıca SDS-PAGE'in *E. coli* izolatlarının taksonomik ve epidemiyolojik çalışmaları için plazmid ve antibiyotik duyarlılık kriterlerinden daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

SDS-PAGE yöntemi sıklıkla kullanılmasına rağmen tür altı düzeyde ayrımı sınırlıdır. Bu nedenle protein profiline dayalı tiplendirme metotları yeterli olmadığından dolayı doğruluğunu kanıtlamak için DNA temelli moleküler yöntemlere başvurulmaktadır. Moleküler yöntemler, DNA temelli analizler olup, tekrarlanabilir olması, uygulanabilirliğin kolay olması, güvenilir yüksek ayırım gücünün olması gibi nedenlerden dolayı günümüzde sıkça kullanılmaktadır (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), bu analizlerin temelini oluşturmaktadır. Moleküler yöntemler arasında; Enterobacterial repetitive intergenic consensus-PZR (ERIC-PZR), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD-PZR), plazmid tiplendirme, pulsed field jel elektroforezi (PFGE) (Sahilah ve ark., 2010), tekrarlayan ekstrasenik elementlerin PZR ile amplifikasyonu (REP-PZR) (Versalovic ve ark., 1991), çoğaltılan fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (AFLP) (Coenye, ve ark., 2005), multilokus enzim elektroforezi (MLEE) (Chansiripornchai ve ark., 2001), denatüre edici jel elektroforezi (DGGE) (Clark, 2005), restriksiyon parçacık uzunluk polimorfizmi (RFLP) (Güneş, 2006), toplam hücre içi ve hücre dışı proteinleri için SDS-PAGE ve Native-PAGE ile analizi (Berber ve ark., 2010) ve 16S rRNA dizi analizi (Berber, 2004) gibi yöntemlerin bakterilerin epidemiyolojik ilişkileri ve genetik çeşitliliklerinin incelenmesinde fayda sağladığı bilinmektedir.

Woese ve ark. (1985), bakterilerin ve diğer yaşam formlarının filogenetik ilişkisinin, genetik şifrenin değişmeyen bir bölgesinin kıyaslanması ile saptanabilir olduğunu ortaya koymuştur. Bakterilerdeki bu genetik alan için incelenmekte olan kısımların 5S, 16S ve 23S rRNA'yı şifreleyen genler olduğu ancak bakterilerde taksonomik amaçlar için en uygun DNA parçasının 16S rRNA geni olduğu bildirilmiştir (Tortoli, 2003; Harmsen ve Karch, 2004). Dizilimin korunması, 16S rRNA'nın hücre fonksiyonunda ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Loh ve ark. (2013), 1055 bitki örneğinden izole ettikleri 977 suşun 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda GenBank/DDBJ/EMBL veritabanıyla %96 benzerlik göstererek tür bazında identifikasyonunu gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir.

Lee ve ark. (2016), 10 hastanın bağırsak dokusundan izole ettikleri *Fusobacterium* spp izolatların tümünü 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda tanımladıklarını rapor etmişlerdir.

2.3. Enzimler ve Bazı Özellikleri

Enzim terimi ilk kez 1878 yılında Wilhelm Kuhne tarafından kullanılmıştır. 1897 yılında ise Eduard Buchner hücrelerden fonksiyonel enzimleri ekstrakte ettiğini bildirmiştir (Paulo ve Gubitz, 2003). Enzimlerin katalitik aktivitelerinin en yüksek olduğu bir sıcaklık değeri bir de pH değeri vardır. Bu değere ‘optimal sıcaklık veya pH değeri’ denir. Bu değerler üzerindeki sıcaklıklarda ve pH değerlerinde molekül içi veya moleküler arası bağların kopması sonucu enzimin yapısı bozulmaya başlar. Ayrıca enzimlerin aktif bölgelerine bağlanan bazı maddeler de enzimin bozulmasına neden olarak katalitik aktiviteyi düşürebilir hatta tamamen durdurabilir. Bu tür maddeler ‘inhibitör’ adı verilir (Kılıçer, 2014; Aehle, 2004). Modern üretim teknikleri ile birlikte enzim endüstrisi ve biyoteknolojisi önemli ilerlemeler kaydederek enzimlerin daha saf, ucuz ve bol miktarda üretilmelerine olanak sağlamıştır (Türker, 2014). Günümüzde tanımlanmış olan 2500’ün üzerinde enzimin yaklaşık %10’undan çeşitli endüstriyel alanlarda ticari olarak faydalanılmaktadır. Bu enzimlerin endüstride %29’u gıda sektöründe; %15’i hayvan yemi sektöründe; %56’sı ise deterjan, farmakoloji, alkol üretimi, tekstil sektörü gibi diğer alanlarda kullanılmaktadır (Özcan, 2015).

2.3.1. Nişasta, Amilazlar ve Amilazların Kullanım Alanları

Nişasta; geniş bir yelpazede hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar için önemli bir enerji kaynağıdır. α -1,4 ve α -1,6 glikozid bağlarıyla bağlanan çok sayıda glikoz moleküllerinden oluşur. Bir nişasta molekülü amiloz ve amilopektin olmak üzere iki adet glikoz polimeri içerir. Amiloz (nişastanın %15-25) α -1,4- glikozidik bağlarından oluşur ve dallanma yapmaz; düz yapıdadır. Amilopektin ise (nişastanın %75-85) glikoz birimleri arasında α -1,4-glikozidik bağlanmasına ek olarak α -1,6-glikozidik dallanma bağ noktalarından oluşur. Nişasta endüstrisinde amilazların kullanımı yaygındır, bu endüstri alanı çok iyi gelişmiş ve aynı zamanda ileri teknolojiyle donatılmıştır. Bu amilazlar dünya endüstriyel enzim üretiminin yaklaşık olarak %30’unu temsil etmektedir (Janecek, 2009; Van der Maarel ve ark., 2002). En iyi

bilinen amilolitik enzimler birbirlerinden tamamen farklı olan α -amilaz, β -amilaz ve glukoamilazdır. Sadece birincil ve üçüncül yapıları değil aynı zamanda katalitik sistem ve reaksiyon mekanizmalarının işleyişleri de farklıdır. Bu yüzden α -amilazlar, β -amilazlar ve glukoamilazlar olarak sınıflandırılırlar (Coutinho ve Reilly, 1997). Genel olarak amilazlar amilolitik parçalanmaya oldukça dirençli olan nişasta granülleri üzerine iyi bir etkiye sahip değildir. Bu yüzden amilazlar ile nişastanın hidrolizasyonu 24 ya da 48 saat gibi uzun bir parçalanma süresine ihtiyaç duymaktadır (Özdemir ve Sıdal, 2013). α -Amilazlar ekmek yapımında, glukoz ve/veya fruktoz şurup üretiminde, biracılık, nişasta, tekstil, kâğıt endüstrisi gibi alanlarda uygulanmakla birlikte medikal ve klinik kimya analizleri ile biyoteknoloji uygulamalarında da kullanılmaktadır. Aynı zamanda elektrolit, izolator ve yarı-iletken kapasitörlü biyosensörlerde amilaz enzimi kullanılmaktadır (Özdemir ve Sıdal, 2013). Deterjanlardaki enzimler, zor lekelerin çıkarılmasında deterjanın yeteneğini artırır ve çevresel olarak deterjanı güvenli hale getirir. Amilazlar, enzimatik deterjanların formülasyonunda kullanılan ikinci tip enzimlerdir. Tüm sıvı deterjanların %90'ını oluşturur (Souza ve Magalhaes, 2010). Etanol en çok kullanılan sıvı biyoyakıttır. Nişasta, dünyanın çoğu bölgesinde kolay elde edilebilen ham madde olup maliyeti de ucuz olduğundan alkol üretiminde en fazla kullanılan substrattır. Bu üretimde nişasta çözülür ve fermente edilebilir şeker elde etmek amacıyla iki enzimatik basamak kullanılır. Nişastanın etanole dönüşümünde sıvılaştırma ve şekerleştirme adı verilen işlemler uygulanır. Bu işlemler için de amilolitik enzimlere ihtiyaç vardır (Souza ve Magalhaes, 2010). Bira yapımında, sindirime yardımcı maddelerin hazırlanmasında, keklerin, meyve sularının ve nişasta şuruplarının yapımı gibi işlenmiş gıda endüstrisinde amilazlardan yoğun bir şekilde yararlanılmaktadır. Amilazlar undaki nişasta içeriklerinin parçalanabilmesi için ekmek hamuruna eklenebilir. Böylece hamurun viskozitesi azaltılmış, fermentasyon oranı artırılmış olur bu da ürünün hacmini ve yapısını verimli hale getirir. Ayrıca ekmeğin kabuk rengini, kızartma niteliğini ve tadını da geliştirir. Bayatlamayı önleyici olarak kullanılıp unlu mamullerin yumuşaklığının korumasına yardım eder. Böylece ürünlerin raf ömrünü uzatır (Souza ve Magalhaes, 2010). Amilazlar tekstil endüstrisinde haşıllama işleminde kullanılır. Hızlı ve güvenli dokuma süreci sağlamak için kumaş üretimi öncesinde nişasta ipliğe uygulanır. Nişastanın haşıllama işleminden sonra kumaştan ayrılması için amilazlar kullanılır (Souza ve Magalhaes, 2010). Yazma işleminin niteliğini geliştirmek için kağıdın yüzeyinin daha pürüzsüz ve dayanıklı olması amacıyla kaplama işlemi yapılır. Nişasta haşıllama ajanı olarak kullanılır bu

şekilde kağıtlara dayanıklılık ve sertlik kazandırılmış olur. Bu işlemten sonra nişastanın fazlasının uzaklaştırılması için amilazlar kullanılır (Souza ve Magalhaes, 2010).

2.3.2. Selüloz, Selülazlar ve Kullanım Alanları

Selüloz, şeker indirgendikten sonra etanol gibi birçok biyoyakıta dönüştürülebilir. Bu nedenle son on yılı aşkın süredir araştırmacılar dünyada en bol yenilenebilir biyokütleyle sahip olan selüloz üzerinde odaklanmıştır (Huang ve ark., 2011). Selüloz, bitkilerin hücre duvarının önemli bir polisakkarit bileşenidir. Ayrıca, biyosferde en bol bulunan organik bileşiklerden biridir. Selülozların biyolojik parçalanmaya karşı doğal bir dirence sahip olması, çözünmez ve sert yapısı dikkate alındığında diğer polisakkaritlerden farklıdır. Genel olarak selülaz olarak bilinen selülotik enzimler; endo- β -1,4-glukanazlar, exo- β -1,4-glukanazlar ve β -glukosidazlardır. Bu üç enzimin sinerjik çalışması ile selülozlardaki β -1,4-glikozid bağları hidroliz edilerek, son ürün olarak glikoz meydana getirebilirler (Yang ve ark., 2010). Bu enzimler gıda, bira, şarap, kağıt, tekstil, deterjan ve hayvansal gıda dahil çeşitli endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılmakla birlikte enerji üretimi için de alternatiftir (Zoppas ve ark., 2013). Selülazlar, tohumlardan yağ ve meyve suyu ekstraksiyonunda, meyve sularının berraklaştırılmasında ayrıca tahılların homojen su çekmesini sağlamak ve yeterince ıslanmasının arttırılmasında kullanılmaktadır. Selülotik enzimler sıvı kazancını arttırmak iyi bir renk elde etmek amacıyla alkol üretiminde kullanılmaktadır. Deterjanlarda, selülazın varlığı renklerin canlanması, yumuşamasına ve partikül halindeki toprağın uzaklaşmasına neden olmaktadır (Niehaus ve ark., 1999).

2.3.3. Proteaz ve Kullanım Alanları

Mikrobiyal kökenli proteaz enzimleri nötral ve alkali ağırlıklı enzimlerdir. *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından yaygınca üretilmektedir. Bakteriyal nötral proteazlar pH:5.0-8.0 aralığında optimum aktivite gösterirken bakteriyal alkali proteazlar pH:10.0 gibi yüksek pH değerlerinde aktivite gösterirler (Turus, 2011).

Proteazlar toplam endüstriyel enzim üretiminin %60'ını oluşturmaktadırlar. Çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira ve atıkların muamelesinde proteazlar kullanılmaktadır. Proteazlar bakteri, küf, maya gibi çeşitli kaynaklardan izole edilsede

Bacillus cinsi bakteriler en önemli grubu temsil etmektedir. Gıda endüstrisinde kullanılan proteaz enzimi, undaki proteinleri etkiler. Proteazlar özellikle bisküvi, kraker ve gofretlerdeki gevrekliği arttırmada kullanılmaktadır (Güven, 2011). Proteazlar; enzim aktivitesi gösteren optimum pH aralığına göre asidik, nötral ve alkalın proteazlar olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bunlardan alkalifil proteazlar deterjan katkı maddesi olarak kullanılırlar. Aynı zamanda yüksek sıcaklık ve pH'da ağartma/oksitleme ajanlarının varlığında stabiliteyi koruyabilmektedir. Deterjan endüstrisinde kullanılacak proteazların en önemli koşulu, enzimin aktif ve stabil olduğu pH aralığıdır. Proteazlar; deniz atıklarının deproteinizasyonunda kullanılmaktadır. Etlerin yumuşatılmasında rol oynamaktadır. Deri endüstrisinde hayvanların cilt ve derilerinin tüysüz olması amacıyla kullanılmaktadır (Kıran ve ark., 2006).

2.4. Enzim Saflaştırma Yöntemleri

Enzim saflaştırma işlemleri; proteinlerin farklı çözünürlüklere, farklı elektrik yüklerine ve farklı molekül büyüklüklerine sahip olması bakımından üç temel özelliğe dayandırılarak gerçekleştirilir.

Proteinlerin çözünürlüklerine göre ayırımında sodyum sülfat veya amonyum sülfat gibi tuzlarla veya trikloroasetik asit (TCA) ile veya aseton, etil alkol gibi organik çözücüler ile çöktürme yöntemleri kullanılmaktadır. İşlem sırasında proteinlerin denatüre olmaması için çöktürme soğukta yapılmalıdır. **TCA ile çöktürme;** aminoasitlerin yan zincirlerindeki iyonik grupların yüklerini değiştirerek iç elektrostatik dengeyi bozar ve proteinin bozulmasına neden olur. Yapıları bozulan proteinlerin çözünürlükleri değişeceğinden çökerler. Çalışmada denatürasyonun önemi yok ise çöktürme işleminden kuvvetli bir asit olan TCA kullanılmaktadır. **Sodyum sülfat veya amonyum sülfat gibi tuzlar ile** proteinlerin çöktürülmesi işlemi ya bulk presipitasyonu ya da fraksiyonlu presipitasyon şeklinde gerçekleştirilir. Proteinlerin bazıları çözeltideki amonyum sülfat konsantrasyonu %25 bazıları ise %75 olduğunda presipite olmaktadır. Bulk presipitasyonunda; gerekli amonyum sülfat miktarı süpernatanta kademeli olarak eklenerek hedef proteinin çökmesi sağlanmaktadır. Fraksiyonlu presipitasyonda ise değişik konsantrasyonda amonyum sülfat çözeltiye eklenerek kullanılan her farklı konsantrasyon uygulamasında çöken proteinlerin ayrı ayrı izolasyonu sağlanır. Bu yöntemle izole edilen proteinler pratikte kullanılmadan önce proteinlerin tuzdan uzaklaştırılması için diyaliz tekniği uygulanmak zorundadır. **Etanol, metanol ve aseton**

ile çöktürme işlemi; hedef proteinin bulunduğu çözeltiye eklenen organik çözücünün ortamdaki konsantrasyonu arttıkça suyun çözücü gücünün düşmesi sonucu protein presipitasyonu gerçekleşmiş olmaktadır. Proteinlerin elektrik yüklerine göre ayırma ve saflaştırma işlemlerinde; elektroforez, izoelektrik odaklama yöntemi, iyon değiştirici kolon kromatografisi kullanılmaktadır. **Elektroforez,** proteinlerin izoelektrik noktalarından farklı bir pH değerine sahip elektriksel bir alanda farklı göçme hızlarına dayanarak gerçekleştirilen bir yöntemdir. Farklı amaçlara göre **denatüre** veya **native (doğal) jel elektroforezi** olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilmektedir. Denatüre jeller sodyum dodesil sülfat (SDS) veya üre gibi denatüre edici ajanların jel içerisinde karıştırılması ile hazırlanarak başta molekül ağırlıklarının hesaplanması olmak üzere proteinlerin saflıklarının araştırılması, konsantrasyonlarının tanımlanması ve enzim aktivitelerinin belirlenmesi gibi birçok amaca hizmet eden bir yöntemdir. **Doğal (Native) Jel elektroforezinde** ise denatüre edici ajanları içermediğinden işlemler doğal şartlarda gerçekleştirilmektedir. Amaç; çok sayıda protein içeren karışımların birbirinden ayrılmasında, protein saflık kontrolü ve proteinin denatüre olup olmadığının saptanmasında kullanılan bir yöntemdir. **İzoelektrik odaklama yöntemi;** yapay elektrolitler kullanılarak oluşturulan elektriksel alanda bir pH gradienti oluşturulması ve her protein molekülünün bu elektriksel alandaki pH gradientinde izoelektrik noktalarının farklılıklarına göre uygun bir yöne göç etmesi esasına dayanmaktadır. **İyon değiştirici kolon kromatografisine,** sabit faz olarak pozitif yüklü dietilaminoetil grupları veya negatif yüklü karboksimetil gruplarını içeren bir kolona, hareketli faz içinde proteinler yüklenir. Proteinler, izoelektrik noktalarına göre farklı pH'daki ortamlarda farklı yük kazanıp ayrılmaktadır. Yük durumlarına göre kolona tutulan proteinlerin kolondan ayrılması için ise yüksek tuz konsantrasyonu ile yıkama işlemi gerçekleştirilerek ayrılma işlemi sağlanmaktadır. Proteinlerin molekül büyüklüklerine göre ayrılmasında ultrasantrifügasyon, diyaliz ve ultrafiltrasyon yöntemi kullanılmaktadır. **Ultrasantrifügasyon yöntemi;** yer çekimi ivmesinin binlerce katına ulaşan çekim alanlarında büyük moleküllerin çökerek ayrılmasına dayanmaktadır. **Diyaliz;** yarı geçirgen bir membran içerisine konulan protein çözeltisi içerisinden küçük moleküllerin membran gözeneklerinden suyla veya tamponla dış ortama geçirilmesi esasına dayanan bir yöntemdir. **Ultrafiltrasyon;** diyalize oranla daha hızlı ve daha yüksek verimle proteinlerin ayrılmasını sağlayan bu yöntemde aradaki fark küçük moleküllerin ortamdan uzaklaşması için hidrostatik basınç veya santrifüj gibi kuvvetlerin etkisinin kullanılmasıdır (Aygan, 2008; Marul, 2007). Kromatografik

ayırma işlemlerinden **ince tabaka kromatografisi (TLC)**; kimyasal bileşikleri ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Genellikle bir yüzey üzerine tutturulan silika jel, alüminyum oksit ya da selüloz gibi ince bir adsorbent tabakadan oluşan sabit faz, sıvı faz için ise saflaştırılması amaçlanan karışımın içinde çözündüğü kapiller etkisiyle çekilebilen uygun bir çözücü kullanılmaktadır. Karışımındaki bileşenlerin miktarını belirlemede, kolon kromatografisi için uygun şartların sağlanmasında ve kolondan elde edilen fraksiyonların analizinde uygulanmaktadır (Aygan, 2008).

2.5. Enzimlerle ilgili Yapılan Çalışmalar

Kumar ve ark. (2010), izole ettikleri amilaz enziminin native jel elektroforezindeki analizi sonucunda moleküler ağırlığının yaklaşık 94.5 kDa olduğunu belirtmişlerdir.

Shanmughapriya ve ark. (2010), *Maribobacter* sp.'den elde ettikleri selülaz enziminin maksimum aktivitesini 27-35°C aralığında ve pH 9.0'da gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar enzimin 37°C'ye kadar stabil kaldığını, 40°C'den yüksek sıcaklıklarda ise aktivitesinin hızla düştüğünü belirtmiştir.

Yang ve ark. (2010), izole ettikleri yüksek selülaz aktiviteye sahip bakteriyi 16S rRNA ile tanımlamışlardır. *B. subtilis* I15 olarak isimlendirdikleri bakteriden izole ettikleri enzimin maksimum aktivitesini 60°C sıcaklık ve pH 6.0'da verdiğini belirtmişlerdir. Enzimin 65°C'de 2 saatlik inkübasyondan sonra orijinal selülaz aktivitesinin %90'ından fazlasını koruyarak oldukça stabil olduğunu da bildirmişlerdir.

Liu ve ark. (2011), soğuğa uyumlu (cold-adapted) amilaz enziminin nişastayla reaksiyonu sonucunda son ürünleri tespit etmek amacıyla ince tabaka kromatografi analizlerini gerçekleştirerek hidroliz ürünlerinin maltoz ve trioaz olduğunu bildirmişlerdir.

Trivedi ve ark. (2011), *B. aquimaris* suşundan izole edilen selülaz enziminin 30 dk süreyle pH 6.0-8.0 arasında %60'dan fazla, pH 9-12 arasında ise %85'in üzerinde stabil olduğunu saptamışlardır.

Shafiei ve ark. (2012), *Nesterenkonia* sp. F suşundan ekstraselüler halofilik α -amilaz enzimini saflaştırarak enzimin karakterizasyonunu incelemişlerdir. SDS-PAGE tekniği kullanılarak 110 kDa molekül ağırlığına sahip tek bir bandın varlığını tespit etmişlerdir. Amilazın maximum aktivitesini pH:7-7.5'de verdiği ve nispeten pH 6.5-7.5

aralığında enzimin stabil, enzimin optimum sıcaklığının ve stabilitesinin 45°C olduğunu belirtmişlerdir.

Sarethy ve ark. (2013), *Bacillus* sp. SI-136 suşundan ürettiği amilazın TLC tekniği ile çözünür nişastayı maltoz ve glukozu hidroliz ettiğini gözlemlemişlerdir.

Annamalai ve ark. (2013), *B. halodurans* CAS 1 suşundan haloalkalin termostabil selüloz enzimini saflaştırarak enzimin molekül ağırlığını 44 kDa olarak hesaplamıştır. Enzim aktivitesi incelendiğinde optimum sıcaklık, pH ve NaCl'sinin sırasıyla 60°C, 9.0 ve %30 olduğunu aynı zamanda enzimin 80°C, pH:12'de %35 NaCl'de bile aktivitesinin %80'inini koruduğunu belirtmişlerdir.

Yang ve ark. (2014), fermente edilmiş geleneksel kore gıdası olan Doenjang'dan izole edilen *B. subtilis* CBD2 suşunun amilaz aktivitesi ve karakterizasyonunu üzerine yaptığı çalışmada enzimin pH:8.0'de 50°C'de en yüksek aktiviteyi verdiğini tespit etmişlerdir.

İbrahim ve ark. (2015), Halotolerant alkalifilik *Bacillus* sp. NPST-AK₁₅ suşundan saflaştırılan termoaktif alkalın serin proteaz enziminin molekül ağırlığını 32 kDa olarak hesaplamışlardır. Enzimin optimum aktivitesini 60°C, termostabilitesinin ise 1 saatlik sürede 30-50°C aralığında stabil olduğunu tespit etmişlerdir.

Ali ve ark. (2016), farklı tuz madenlerinden izole ettikleri 54 bakteri suşunun skim milk agarda proteolitik aktivitesini araştırmışlardır. Maximum proteaz aktivitesi gösteren BLK-1.5 suşunun 16S rRNA gen sekans analizi sonucunda *Bacillus subtilis* olarak karakterize etmişlerdir. Suştan saflaştırdıkları enzimin optimum aktivitesinin 50°C, pH:10 %2 NaCl'de gözlemlemişlerdir. Enzimin molekül ağırlığını ise 38 kDa olarak hesaplamışlardır.

3. MATERYAL ve METOT

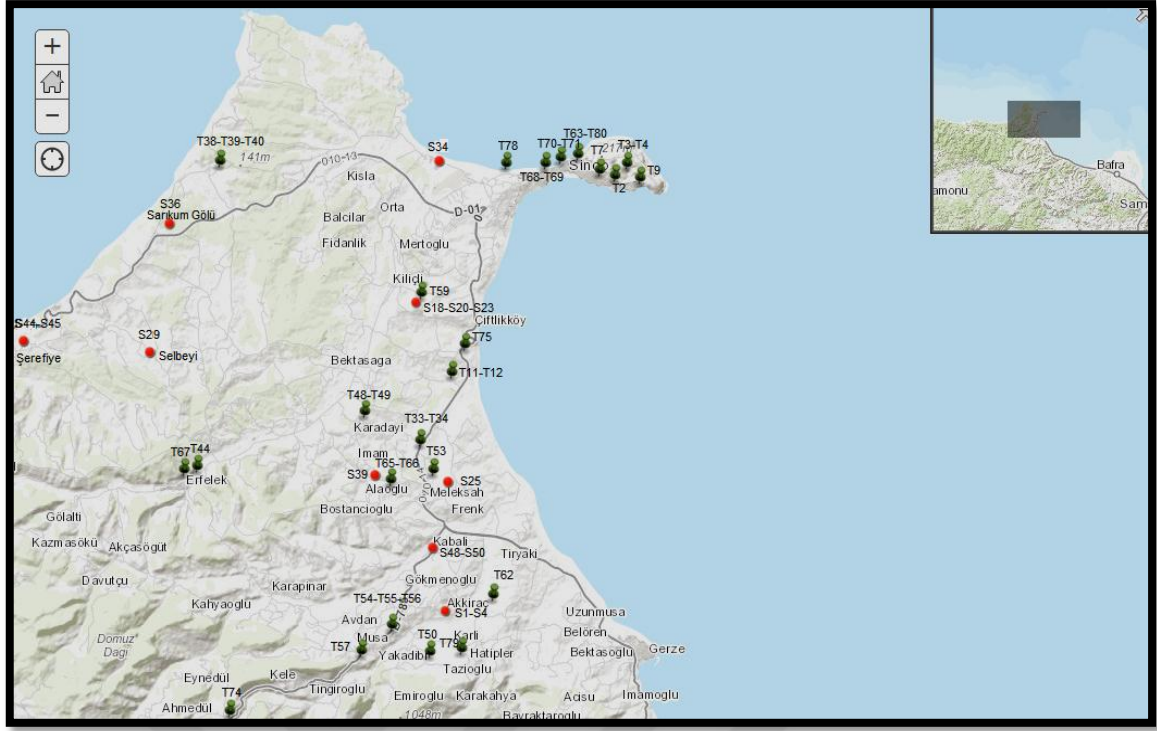
3.1. Materyal

Bu çalışmanın materyalleri Sinop ilinden temin edilmiştir. Sinop Karadeniz kıyı şeridinin en çok sivrilerek uzanmış bulunan Boztepe Burnu ve Yarımadası üzerine kurulmuştur. 5862 km²'lik yüzölçümüyle Türkiye coğrafyasının % 0,8'ini kaplar. En çok Aralık ve Ocak aylarında, en az Temmuz ve Ağustos aylarında yağış alan Sinop ilinin yağışlı gün sayısı ortalama 125-135 gün arasındadır. En yüksek sıcaklığı 34,4°C ve en düşük sıcaklık -7,5°C'dir. Ortalama deniz suyu sıcaklığı 15,9°C olan Sinop'ta ortalama güneşlenme süresi 5,46 sa/gün'dür. Nispi nem ortalaması yönünden sahil kesimleri %75 üzerinde, iç kesimler ise %60 altındadır (Anonim, 2015a ve Anonim, 2015b).

Bu çalışmanın materyallerini Eylül-Aralık 2014 tarihleri arasında Sinop ilinin farklı bölgelerinden alınan toprak ve su (göl suyu ve kaynak suyu) örneklerinden izole edilen 80'i toprak kökenli, 46'sı su kökenli olmak üzere 126 adet *Bacillus* spp. izolatu oluşturmuştur. Numunelerin alındığı istasyonlar Çizelge 3.1-2'de ve istasyonları gösteren bölge haritası Şekil 3.1'de verilmiştir.

3.1.1. Örneklerin Toplanması

Örnekler belirlenen istasyonlardan manuel yöntemlerle alınmıştır. Toprak numuneleri yüzeyden 0-20 cm derinlikten steril spatülle alınarak 100 mL'lik steril şişelere konulmuştur. Göl suyu örnekleri yüzeyden, kaynak suyu örnekleri direkt olarak 100 mL'lik steril şişelere konulmuştur. Araziden alınan örnekler soğuk zincirle laboratuara getirilmiştir.



Şekil 3.1. Örnekleme istasyonları (Sinop maps arcgis, 2015)

Çizelge 3.1. Su Örneklerinin Alındığı İstasyonlar ve Suşların Sembolik Gösterimi

İstasyonlar	Örneklerin Alındığı Lokalite	Suşların Sembolik Gösterimi
1. İstasyon	Akkırac	S1-S4
2. İstasyon	Hacıoğlu- Mera Suyu	S23
3. İstasyon	Hacıoğlu-Kuyu Suyu	S18-S20
4. İstasyon	Melikşah	S25
5. İstasyon	Selbeyi	S29
6. İstasyon	Aklıman 2. Köprü altı Göl Suyu	S34
7. İstasyon	Sarıkum Göl Suyu	S36
8. İstasyon	Aloatlu	S39
9. İstasyon	Kabalı- kaynak Suyu	S48-S50
10. İstasyon	Şerefiye	S44-S45

Çizelge 3.2. Toprak Örneklerinin Alındığı İstasyonlar ve Suşların Sembolik Gösterimi

İstasyonlar	Örneklerin Alındığı Lokalite	Suşların Sembolik Gösterimi
1. İstasyon	Karakum Spor Alanı	2
2. İstasyon	Paşa Tabyaları	3-4
3. İstasyon	Love Story Sahil Yolu	7
4. İstasyon	Karakum Çeşmesi	9
5. İstasyon	Organize Sanayi Bölgesi	11-12
6. İstasyon	Kılıçlı	58
7. İstasyon	Abalı	29
8. İstasyon	Taşmanlı	33-34
9. İstasyon	Sarıkkum(Göl kıyısı-İç Kesim)	38-39-40
10. İstasyon	Erfelek-Selbeyi Köyü	44
11. İstasyon	Kabanlar	51
12. İstasyon	Dizdaroglu	48-49
13. İstasyon	Yakadibi- Ekşioğlu Köyü	50
14. İstasyon	Lala	53
15. İstasyon	Sinecan-Musa Mahallesi	54-55-56
16. İstasyon	Tangal	57
17. İstasyon	Hacıoğlu	59
18. İstasyon	Çırnık	62
19. İstasyon	Kefevi	63-80
20. İstasyon	Aloğlu	65-66
21. İstasyon	Erfelek- Kınık Köyü	67
22. İstasyon	İl Özel İdare	68-69
23. İstasyon	Eski Garaj	70-71
24. İstasyon	Çakıldak	74
25. İstasyon	Demirci Köyü	76
26. İstasyon	Bostancı	78
27. İstasyon	Yuvalı	79

3.2. Metot

3.2.1. *Bacillus* spp. Suşlarının İzolasyonu

Toprak örneklerinden 1'er gram tartılıp 5 mL steril distile su ile karıştırıldıktan sonra süspansiyon haline getirilmiştir. *Bacillus* spp. sporlu bir bakteri olduğu için elde edilen süspansiyonlar 80°C'de 10 dk pastörizasyon uygulanmıştır (Lennete ve ark., 1985). 1:9 oranında dilüsyonlar hazırlanarak karıştırıcıda (Waring, USA) homojenize edildikten sonra 0.1 mL örnek, Nutrient Broth besi ortamında 24 sa 37°C'de

inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besi yerinde aktifleştirilen örnekler Nutrient Agar ortamında saf kültür elde etmek için çizgi yöntemiyle ekilerek 37°C’de inkübe edilmiştir. Gelişen kolonilere Gram boyama yapılarak Gram-pozitif çubuk şeklinde görülen koloniler Nutrient Agar besi yerinde bir gecelik inkübasyon sonunda gelişen saf stok kültürleri +4°C’de saklanmıştır. Stoklanan kültürler 2 ayda bir pasajlanarak devamlılığı sağlanmıştır.

0.1 mL su örneği Nutrient Broth besi yerinde 24 sa 30°C’de aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen örnekler Nutrient Agar ortamında saf kültür elde etmek için çizgi yöntemiyle ekilerek 30°C’de inkübe edilmiştir. Gelişen kolonilere Gram boyama yapılarak Gram-pozitif çubuk şeklinde görülen koloniler stok kültür olarak +4°C’de saklanmıştır.

3.2.2. İzolatların Teşhisi

İzolatların fenotipik özelliklerini belirlemek için bazı biyokimyasal testler uygulanmıştır. İzolatların tanısında kullanılan besi yerleri EK-1’de solüsyon ve boyalar EK-2’de verilmiştir.

3.2.2.1. Gram Boyama

Mikroorganizmaların karakterizasyonu ve sınıflandırılmasında kullanılan önemli bir adımdır. 18-24 saatlik saf kültürden steril öze ile alınan bakteri örneği 1 damla serum fizyolojik bulunan lam üzerine örnek yayılmıştır ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler birkaç defa alevden geçirilerek fiske edilmiştir. Fikse edilen preparat kristal violet ile kaplanarak yaklaşık 1-2 dk bekletilip distile su ile yıkanarak üzeri lugol çözeltisi ile kaplanmıştır. 1-2 dk bekletildikten sonra preparat önce distile su ile yıkanarak 30 sn kadar %96’lık etil alkol ile dekolarizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Distile su ile yıkanmıştır. Son olarak preparat safranin ile kaplanarak 30-45 sn bekletilmiştir. Preparat distile su yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra preparata immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta (Leica-DM 500, Japan) incelenmiştir. Mavi-Mor renkte görünen koloniler Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2008)

3.2.2.2. Endospor Boyama

Fikse edilmiş lam malaşit yeşili ile kaplanmıştır. Preparat yaklaşık 5 dk boyunca ateşte bekletilmiştir. Ardından lam önce etil alkohol ile muamele edilmiştir. Hemen sonra distile su ile yıkanmıştır. Preparat üzerine safranin çözeltisi eklenerek 1-2 dk sonra distile su ile yıkanmıştır. Preparat kurutulup immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta (Leica-DM 500, Japan) incelendi. Sporlar yeşil bakteri ise kırmızı-pembe görünmüştür (Sekin ve Karagözlü, 2006).

3.2.2.3. Katalaz Testi

Bu test, mikroorganizmaların katalaz enzimini sentezleyip sentezlemediğini belirlemek amacıyla yapılır. Katı besi yeri ortamında gelişen taze saf kültürlerin yüzeyine %3'lük H_2O_2 damlatılmıştır. Hava kabarcıklarının oluşması pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2008).

3.2.2.4. Jelatin Hidrolizi

Bu test, mikroorganizmaların jelatini hidrolize eden jelatinaz enziminin sentez yeteneğini ölçmede kullanılır. İçerisinde %10-15 jelatin bulunan Nutrient Broth besi yerine taze saf kültürden iğne özeyle dik olarak ekim yapılmıştır. Tüpler $37^{\circ}C$ 'de 1-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından tüpler kontrol gruplarıyla beraber 1 saat buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda tüpteki besi yerinde sıvılaşmanın olması pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2008).

3.2.2.5. Nitrat Redüksiyon Testi

Test edilecek mikroorganizmanın taze saf kültürü hazırlanmıştır. İçerisinde Durham tüpü bulunan nitratlı besi yerine ekimleri yapılmıştır. $37^{\circ}C$ 'de 1-5 gün inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda Durham tüpleri içinde gaz oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir. Tüplere Griess-Ilosvay ayıraçlarından (A+B) 5'er damla koyulup renk değişimi kontrol edilmiştir. Rengin kırmızıya dönmesi ortamda nitritin varlığını göstermiştir.

3.2.2.6. Voges-Proskauer Testi

Bu test mikroorganizmaların glikozu fermente ederek nötral bir ürün olan asetoini meydana getirme yeteneğini belirlemek için kullanılır. İzolatlar MR-VP sıvı besi yerine ekilip, 37°C’de 2-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda besi yerine 0,6 ml alfa-naftol–etil alkol karışımı olan VP indikatörü ve 0,2 ml %40’lık KOH ilave edilmiştir. Test sonucunda pembe renk oluşumu (+), sarı renk oluşumu (-) olarak değerlendirilmiştir (Aydın, 2004).

3.2.2.7. H₂S Testi

Bu test mikroorganizmaların sülfür içeren bazı aminoasitleri veya bileşikleri ayrıştırarak hidrojen sülfür meydana getirebilme yeteneklerinin tayininde kullanılır. Test edilecek mikroorganizmaların taze saf kültürlerinden iğne özeyle alınıp, yatık olarak hazırlanmış Triple Sugar Iron (TSI) besi yeri bulunan tüplere ekimleri yapılarak 37°C’de bir gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından siyah rengin görüldüğü tüplerdeki suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sekin ve Karagözlü, 2006).

3.2.2.8. Tuz Tolerans Testi

Mikroorganizmaların farklı NaCl konsantrasyonlarında üreyebilme yeteneğini belirlemek için yapılır. %2, %5, %7 ve %10 NaCl içeren Nutrient Broth besi yerine taze saf kültürden ekimler yapılarak 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüpte oluşan bulanıklık pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.9. Sıcaklık Tolerans Testi

Mikroorganizmaların farklı sıcaklıklarda gelişip gelişemediğini belirlemek için yapılır. Buna göre ekimleri yapılan Nutrient Broth besi yeri +4°C, 25°C, 45°C, 55°C ve 65°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda tüplerde oluşan bulanıklık pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.10. pH Tolerans Testi

Mikroorganizmaların farklı pH değerlerinde üreyip üreyemediğini belirlemek için yapılır. Buna göre 5-10 arasındaki pH değerlerinde Nutrient agar hazırlanmıştır. Hazırlanan besi yeri ortamına çizgi şeklinde ekilen izolatlar 37°C’de 24 sa inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda üremenin görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.11. Karbonhidrat Fermantasyon Testi

Mikroorganizmaların karbonhidratları ayrıştırma yeteneklerini tespit etmek amacıyla yapılmıştır. İçerisinde %1 oranında karbonhidrat bulunan fenol red indikatörlü besiyerine aktifleştirilmiş kültürlerden 0,1 ml alınarak karbonhidrat içeren tüplere ekimi yapılmıştır. 37°C’de 1-10 gün inkübasyona bırakılarak tüpler her gün kontrol edilmiştir. Besi yerinin renginin kırmızıdan sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.12. SDS-PAGE Analizi

Toplam hücre proteinlerinin ekstraksiyonu için Laemmli (1970)’nin geliştirdiği, Berber ve ark. (2003) tarafından modifiye edilen yöntem kullanılmıştır. Toprak ve su örneklerinden izole edilen *Bacillus* spp., suşları 24 saat süreyle Nutrient Broth besi yerinde geliştirilerek aktifleştirilmiştir. Gelişen örneklerden 5’er mL NB besi yeri içeren tüplere bir öze dolusu aşılama yapılarak 37°C’de 24 saat geliştirilmiştir. Bu süre sonunda gelişen örneklerden 1,5 mL temiz bir ependorf tüpüne alınmıştır. 12.000 rpm de 5 dk santrifüj (Hanil Science Industrial, HM-150 IV, Japan) edilmiştir. Supernatant fazı atılarak pellet üzerine 100 µl serum fizyolojik ilave edilerek 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında kalan pellet üzerine 20 µl örnek tamponu (sample buffer) ilave edilmiştir. Daha sonra 80°C’de 5 dk kaynatılarak çözünür proteinler ekstrakte edilmiştir. Örnekler -20°C’de saklanmıştır. Toplam hücre proteinleri 1 mm kalınlığında (%4’lük toplayıcı ve %10’luk ayırıcı) jelde dikey elektroforez tankında (Hoefer SE400-USA) toplayıcı jel boyunca 20 mA ve ayırıcı jel boyunca 30 mA’lik sabit akım uygulanarak yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak jeller Comassie Brilliant

Blue (R-250) ile boyanarak (Laemmli, 1970) jellerin fotoğrafları (HP Scan-jet G2410) çekilerek diğer işlemler için bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek için PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas, SM0661) kullanılmıştır. Jeller %7'lik asetik asit solüsyonunda bekletilmiştir. Poliakrilamid jel elektroforezde kullanılan tampon ve çözeltiler EK-3'de verilmiştir.

3.2.2.13. Plazmid Analizi

Plazmid DNA ekstraksiyonu için O'sullivan ve Klaenhammer (1993), yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. *Bacillus* spp., örneklerinden 5 ml LB besi yerine tek koloniden ekimler yapılmış ve 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. 1.5 ml'lik bakteri bir eppendorf tüpüne aktarılmış ve 10.000 rpm hızda 1 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz atılarak pellet içerisinde bulunan bakteriler, 200 µl 30 mg/ml lizozim içeren %25 süktrozda çözdürülerek 37°C'de 15 dk bekletilmiştir. Çözeltiye 400 µl alkalın SDS solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 7 dk bekletilmiştir. Çözelti üzerine 300 µl soğuk 3 M sodyum asetat (pH:4,8) eklenip 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant temiz eppendorfa alınmış ve üzerine 650 µl oda sıcaklığında olan izopropanol eklenip 15.000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Tüm sıvı atılıp kalan pellete 320 µl steril dH₂O, 200 µl 7,5 M amonyum asetat ve 350 µl fenol/kloroform eklenerek 15.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni tüpe alındı ve 1 ml soğuk (-20°C) etanol eklenip 15.000 rpm'de 15 dk santifüj edilmiştir. Pellet üzerine %70'lik etil alkol eklenerek plazmid DNA'sı yıkanmıştır. Alkol uzaklaştırılıp pellet 40 µl TER (TE+RNase) içinde çözdürülmüştür. Analize kadar -20°C'de saklandı. Plazmid DNA için kullanılan çözeltiler Ek-4'de verilmiştir.

3.2.2.14. Genomik DNA Analizi

Bacillus spp. suşlarının genomik DNA izolasyonu, Sambrook ve ark. (1989)'nın yönteminde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. *Bacillus* örneklerinden 5 ml LB besi yerine tek koloniden ekimler yapılmış ve 37°C'de bir gece gelişmeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 5 ml'lik bakteri kültüründen 1,5 ml steril eppendorfa alınıp mikrosantrifüjde (Hanil Science Industrial, HM 150 IV) 10.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra pellet 500 µl TE tamponu içerisinde

Çizelge 3.4. PZR Reaksiyon Karışımı

PCR bileşenleri	Hacim (µl)
Distile su	40 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
10X PCR tamponu	5 µl
dNTP mix (10 mM)	0.5 µl
Primer 1(50 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (50 pmol/µl)	0,5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	1 µl
PCR karışımının toplam hacmi	49 µl
Bakteri DNA'sı	1 µl
Toplam hacim	50 µl

Çizelge 3.5. PZR Koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	7 dk	1
Denatürasyon	94	1 dk	
Primer Bağlanması (Annealing)	54	1dk	25
Zincir Uzaması (Extension)	72	1.5 dk	
Son Uzama (Extension)	72	6 dk	-
Bekleme	4	∞	∞

PZR uygulamaları Techne TC-5000 (California-USA) marka cihazda yürütüldü. Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örnekler elektroforez işlemleri yapılncaya kadar + 4°C'de bekletildi.

3.2.2.17. 16S rRNA için Agaroze Jel Elektroforezi

PZR reaksiyonu tamamlanan örnekler %1,8'lik agaroz jelde 1X TBE bufferde yürütülmüştür. Örnekler jele yüklendikten sonra jel 80 voltluk sabit akımda yaklaşık 2,5-3 saat süreyle elektroforez cihazında (Thermo Scientific-MS1509112955, UK) yürütülmüştür. Yürütme işleminin bitiminde jellerin fotoğrafları UV transillüminatör

(Cleaver-MicroDOC, UK) altında çekilmiştir (Şekil 4.8.). Sekans analizi için hizmet alımı yapılmıştır.

3.2.2.18. Plazmid ve Protein profillerinin İstatistiksel Analizi

Plazmid ve protein bandlarının moleküler ağırlıkları Total Lab 1D Manual R11.1, UK programı kullanılarak hesaplanmıştır. Jel görüntüleri programa yüklendikten sonra bandlar piksel pozisyonlarına göre belirlenmiştir. Bu işlemlerin ardından işaretlenen bandlar moleküler ağırlıkları marker'a göre belirlenmiştir. Kümeleme analizi için veriler Phoretix 1D-Pro (TotalLab, UK) programı kullanılarak Jaccard'ın benzerlik katsayısı temeline göre unweighted pair-group metod using arithmetic averages (UPGMA) metoduyla hesaplanarak dendrogramlar oluşturulmuştur.

3.2.2.19. 16S rRNA İstatistiksel Analizleri

MedSanTek firmasından hizmet alımı yapılmıştır. Dizi analizleri ClustalW (Multiple sequence Alignment) kullanılarak hizalanmıştır. Elde edilen diziler GenBank veri tabanında bulunan referans diziler ile BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

3.2.3. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Enzimlerin aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan besi yerleri, poliakrilamid Jel Elektrofrezinde kullanılan tampon ve çözeltiler ile boya ve çözeltiler EK-7'de verilmiştir.

3.2.3.1. Katı Besi Yerinde Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İzole edilen *Bacillus* suşları pH:7 olan M9 Nişastalı agar besi yerine çizgi şeklinde ekimleri yapılarak 37°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda suşların amilaz aktivitelerinin belirlenmesi için petri kutusunun kapağına dökülen iyot buharına tutularak boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Boyama

işlemi sonunda nişasta içeren zemin koyu maviye boyanırken, amilaz enzimi üreten kolonilerin çevresinde şeffaf zon oluşumunun gözlenmesiyle, bu suşlar amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Arikan, 2008).

3.2.3.2. Katı Besi Yerinde Selülaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İzole edilen suşlar pH:7 olan CMC Agar besiyerine çizgi şeklinde ekimleri yapılarak 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda petri kutusuna iyot solüsyonu çözeltisinden dökülerek suşlar yaklaşık 5 dk boyunca boyanmıştır. Boyama işlemi sonunda kolonilerin çevresinde şeffaf zon oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Kasana ve ark., 2008)

3.2.3.3. Katı Besi Yerinde Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İzole edilen suşlar pH:7 olan skimmilk’li agar besiyerine çizgi şeklinde ekilerek 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerindeki kolonilerin etrafında şeffaf zon görünmesi proteaz pozitif, görülmemesi ise proteaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Adinarayana ve ark, 2003).

3.2.3.4. *Bacillus* Suşlarının Katı Besi Yerinde Ürettiği ve Enzim Sentezlerinin Gerçekleştiği Sıcaklık ve pH Aralığının Saptanması

Bu amaçla pH’sı 5-10 arasında değişen değerler ve 25°C, 35°C, 45°C ve 55°C sıcaklıklar için Nişastalı M9, CMC agar, skimmilk’li agar besiyerleri hazırlanarak tanımlamaları yapılan amilaz, selülaz ve proteaz pozitif suşlar agar içeren katı besiyerlerine ekilmiştir.

Amilaz pozitif olanlar 72 saat, selülaz ve proteaz pozitif olanlar ise 24 saat süresince 37°C’de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda üreme ve enzim sentezinin gerçekleştiği pH ve sıcaklık aralığı, koloni ve aktivite zon çapları ölçülerek saptanmıştır (Voget ve ark, 2006).

3.2.3.5. Optimum Üreme ve Enzim Prodüksiyonu İçin Gerekli Tuz Konstrasyonlarının Saptanması

Enzim sentezleme yeteneği pozitif suşlar içerisinde her üç enzim için uygun substratların bulunduğu, farklı konstrasyonlarda tuz içeren (%3, %5, %7, %10, %13, %15 ve %20) besi yerlerine ekim yapılarak her üç enzim için uygun süreyle belirlenen sıcaklıklarda üretilmiş ve aktivite analizleri yapılmıştır (Aygan, 2008).

3.2.3.6. Sıvı Kültürde Amilaz Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırması

Enzim aktivitesi yüksek olarak belirlenen suş; optimum pH ve tuzlulukta nişastalı sıvı besi yerine aşılanmıştır ve optimum olduğu sıcaklıkta 72 saat 250 dev/dk çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Süre sonunda +4°C’de ve 5000 dev/dk 45 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiştir. Süpernatant temiz bir ortama alınıp üzerine %70 oranında %96’lık soğuk etil alkol ilave edilerek -33°C’de bir gün bekletilmiştir. Bu işlemi takiben, örnek +4°C’de ve 5000 dev/dk 45 dakika santrifüj edilerek enzim sıvı fazdan geri kazanılmıştır. Çökelti pH:7.0’de 0,1 M’lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek +4°C’de saklanmıştır (Üzümcü ve ark., 2013; Bernfeld, 1995).

3.2.3.7. Sıvı Kültürde Selülaz ve Proteaz Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

Enzim üretimi için seçilen suşlar; uygun pH ve tuzlulukta CMC ve skimmilk’li sıvı besi yerinde optimum sıcaklıkta sırasıyla 48 saat ve 24 saat çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Kültür +4°C’de 5000 dev/dk 45 dk santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiştir. Süpernatant amilaz enzim üretiminde olduğu gibi temiz bir ortama alınıp üzerine %70 oranında %96’lık soğuk etil alkol ile muamele edilerek -33°C’de 24 sa bekletilmiştir. Süre sonunda +4°C’de 5000 dev/dk 45 dk santrifüj edilerek enzim sıvı fazdan geri kazanılmıştır. Pellet; pH:7 0,1M fosfat tamponunda +4°C’de saklanmıştır (Arikan, 2008).

3.2.3.8. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması

Kısmi saflaştırma yöntemi ile elde edilen enzimlerin optimum pH değerinin saptanması için %1 kazein, CMC ve nişasta içeren Na-fosfat (pH:6.0-8.0), Glisin-NaOH (pH:8.5-10.5), Boraks-NaOH (pH:11-12.5) tamponları kullanılmıştır. Aktivite tayini için 0,5 mL enzim ve 0,5 mL farklı pH'larda hazırlanmış substrat karıştırılmıştır. Proteaz ve Amilaz enzimi 45°C'de selüloz enzimi 55°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda enzim-substrat karışımına toplam hacmi kadar %10'luk TCA (proteaz enzimi için) ve DNS (amilaz ve selüloz) çözeltisinden eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Örnekler 5 dk kaynatma işleminden sonra soğutma işlemi uygulanmıştır. 550 nm (amilaz ve selüloz) ve 280 nm (proteaz) dalga boyunda köre karşı okuma yapılarak absorbans değerleri elde edilmiştir (McTigue ve ark., 1995; Ege ve ark.,1998; Arıkan, 2008). En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH 100 olarak kabul edilmiştir. Diğer pH değerleri de bu değere göre oranlanarak kalan enzim aktivitesi saptanmıştır.

3.2.3.9. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanması

Aktivite tayini için 0,5 mL enzim ve 0,5 mL optimum pH'da hazırlanmış substrat bir tüpte karıştırılmıştır. 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100°C'de su banyosunda 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda toplam hacim kadar %10'luk TCA ve DNS çözeltisinden eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. 5dk'lık kaynatma ve ardından soğutma işlemi uygulanarak 550 nm ve 280 nm dalga boyunda köre karşı okuma yapılmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği sıcaklık 100 kabul edilerek diğer sıcaklık değerleri hesaplanmıştır (McTigue ve ark., 1995; Ege ve ark.,1998; Arıkan, 2008; Nouadri ve ark., 2010).

3.2.3.10. Enzimlerin Sıcaklık Stabilitesinin Saptanması

Sıcaklık stabilitesinin hesaplanması için enzimler 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100°C'de 30 dk boyunca ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon sonrasında 0,5 mL enzim ve optimum pH'da hazırlanmış substrat bir tüpte karıştırılarak optimum

sıcaklıkta su banyosunda 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda DNS (amilaz ve selüloz) ve %10 TCA (proteaz) eklenerek enzim durdurularak 5 dk soğutma işlemi uygulanmış ve spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır (Arikan, 2008; Burhan ve ark., 2003). Ön işlemde geçirilmemiş enzim örneğinin analizi sonucunda elde edilen absorbans değeri 100 kabul edilip diğer sonuçlar bu okunan değere göre oranlanarak kalan enzim aktivite hesaplanmıştır.

3.2.3.11. Enzimlerin pH Stabilitesinin Saptanması

Enzimlerin pH stabilitesinin saptanması için pH:7.0; 8.0; 9.0; 10.0; 10.6; 11.0 ve 12.0 değerleri seçilmiştir. Stok enzimlerden 2 mL ependorf tüplere alınarak 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine hazırlanan pH tamponlarından eklenerek enzimin sıvılaşması sağlanmış ve optimum sıcaklık değerlerinde 24 saat ön inkübasyona bırakılmıştır (Egas ve ark., 1998; Burhan ve ark., 2003). Ön işlem uygulanmamış enzim örneğinin analizi sonucu elde edilen absorbans değeri 100 kabul edilerek ön işlemde geçirilmiş örneklerden elde edilen değerlerin oranlanması sonucu kalan enzim aktivite hesaplanmıştır.

3.2.3.12. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Saptanması

Stok enzim örneğinden 2 mL ependorf tüplere alınarak 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra pellet üzerine %3; %5; %7,5; %10; %15 ve %20 NaCl çözeltilerinden 2 mL eklenmiştir. Sıvılaşan enzim optimum sıcaklıkta 1sa ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyondan sonra 0,5 mL enzim ve optimum pH'da hazırlanmış substrat karıştırılarak optimum aktivitenin gerçekleştiği sıcaklıkta 30 dk boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Örnek üzerine eşit hacimde DNS ve %10'luk TCA eklenerek enzim aktivitesi durdurularak spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır (Aygan, 2008; Haliskaranfil, 2012).

3.2.3.13. İnhibitörlerin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri

Enzim inhibitörü olarak 5 mM EDTA, 5 mM CaCl₂, 5 mM BaCl₂, 5mM ZnCl₂, 5 mM MnCl₂, 5 mM Na₂SO₃, 5mM Üre, 5 M IAM, %1v/v β-Merkaptoetanol, %1w/v SDS ve %1v/v Triton X-100 kullanılmıştır. Her bir inhibitör madde için stok enzim örneğinden 2 mL ependorf tüplere alınarak 15.000 rpm de 15 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz atılarak 2 mL olarak hazırlanan inhibitör çözücüler pellet üzerine eklenmiştir. Örnekler 1 sa ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön işlemden sonra her tüpten 0,5 mL enzim alınıp üzerine 0,5 mL optimum pH'da hazırlanmış substrat eklenerek optimum aktivitenin gerçekleştiği sıcaklıkta 30 dk inkübe edilmiştir. Ön işlem uygulanmamış enzim örneğinin analizi sonucu elde edilen absorbans değeri 100 kabul edilerek ön işlemden geçirilmiş örneklerden elde edilen değerlerin oranlanması sonucu kalan enzim aktivite hesaplanmıştır (Lo ve ark., 2001; Burhan ve ark., 2003).

3.2.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (PAGE) Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi

Enzimlerin molekül ağırlıkları ve zimogram analizleri için SDS-PAGE Jel ve Native Jel sistemleri kullanılmıştır.

3.2.4.1. SDS-PAGE Sisteminin Hazırlanması

Ayırıcı ve dengeleyici jelin bileşimi EK-4'te belirtilen oranlarda hazırlanmıştır. Önce %12'lik ayırıcı jel cam plakaya dökülmüştür. Jelin üst yüzeyi düzgün bir tabaka elde etmek amacıyla 1:1 bütanol-su karışımıyla kapatılarak oda sıcaklığında polimerizasyona bırakılmıştır. Ayırma Jelinin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra 1:1 bütanol-su karışımı uzaklaştırılmıştır. Jele örnek sayısına uygun tarak yerleştirilerek üzeri uygun hacimde dengeleme jeli ile örtülmüş ve oda sıcaklığında polimerizasyona bırakılmıştır (Turus, 2011).

3.2.4.2. Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler 5 dk kaynatılarak tam bir denatürasyon sağlanmıştır. Eğer uygulama doğal (Native) jel ise kaynatma işlemi uygulanmamıştır. Enzim örneklerinden 30 µl jele yüklemeye yapılmıştır. Görünür bandların moleküler ağırlığını tespit etmek amacıyla marker proteini kullanılmıştır. Yürütme işlemi dikey elektroforez tankında dengeleyici jel boyunca 25 mA, örnek ayırıcı jele ulaşıncaya 12 mA akım uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Turus, 2011).

3.2.4.3. Zimogram Analizi İçin SDS-PAGE Sisteminin Hazırlanması

Selülaz ve Proteaz enzimlerinin zimogram analizleri CMC ve kazein içeren SDS-PAGE’de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan jel karışımına %3’lük CMC (w/v), proteaz (w/v) çözeltilerinden 1 mL eklenerek polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonraki uygulamalar standart SDS-PAGE uygulamasına göre yapılmıştır (Turus, 2011).

3.2.4.4. Amilaz Enzimi Zimogram Analizi İçin Doğal (Native) Jelin Hazırlanması

Jel bileşenleri SDS’siz olarak hazırlanır. Jel karışımlarının hazırlanması ve elektroforez uygulaması önceki aşamalarda anlatıldığı gibidir. Jel elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler EK-3’te verilmiştir.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel pH’sı 8 olan Nişastalı 50 mM Glisin-NaOH tamponu içerisinde 40°C’de çalkalamalı inkübatör kullanılarak (50 devir/dk) 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda lügol çözeltisi kullanılarak 5-10 dakika boyama yapıp aktivite zonu aranmıştır (Aygan, 2008).

3.2.4.5. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram Analizleri

Elektroforezden sonra çıkarılan jel boyama solüsyonuna (Ek:3) konulmuştur. Bir gece boyama solüsyonu içinde bırakıldıktan sonra saf su ile birkaç kez yıkanmıştır. Boyanın uzaklaştırılması amacıyla yaklaşık 4 saat boya çıkarma solüsyonunda

bırakılarak örnekler görünür hale gelmiştir. Süre sonunda jel saklama solüsyonunda tutulmuştur.

SDS-PAGE uygulamasında zimogram analizi amaçlandığında boyama işlemi yerine renatürasyon işlemi uygulanmıştır. Renatürasyon işlemi üç farklı çözeltide farklı sıcaklık süreler kullanılarak jelden SDS'nin çıkarılması esasına dayanır. Bu amaçla jel solüsyon 1'de 1 saat (50 devir/dk), solüsyon 2'de bir gece +4°C'de bekletilmiştir. Solüsyon 3'te ise 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Renatürasyon işleminden sonra jel steril bir kaba alınıp enzimin izole edildiği sıcaklıkta 6 saat inkübasyon yapılmıştır. Inkübasyonun sonunda selülaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla %0,1'lik Kongo Red (w/v) çözeltisinde 15 dk boyama yapılmıştır. Ardından 1 M NaCl çözeltisi kullanılarak boyanın geri alınması işlemi gerçekleştirilmiştir. Sarı zonlar enzimin aktivite gösterdiği bölgelerdir. Amilaz enzimi aktivasyon zonunu belirlemek için ise jel iyodin boyası (100 mL) içerisine alınarak 15 dk boyama işlemi uygulanmıştır. Oluşan şeffaf zon enzimin aktivite gösterdiği bölgedir (Aygan, 2008; Haliskaranfil, 2012).

Proteaz enziminin renatürasyon işlemi ise iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada jel %2,5'luk Triton- X100 solüsyonun içine konularak 1 saat süreyle SDS'nin uzaklaştırılması için inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Diğer aşamada ise jel 50 mM Tris-HCl (pH:7.5) çözeltisine alınarak 40°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda jel %10 TCA ile muamele edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Renatürasyon işlemi tamamlandıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue R250 boyası ile boyanarak aktivite bantları görünür hale getirilmiştir. Aktivite bantlarının moleküler ağırlıkları marker ile kıyaslanarak hesaplanmıştır (Arikan, 2008; Turus, 2011).

3.2.5. Enzim Substrat Reaksiyonu Sonunda Açığa Çıkan Son Ürünlerin Saptanması

Enzim-substrat etkileşimine bağlı olarak substratların hidrolizi sonucunda son ürün veya ürünlerin saptanması için İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) uygulanmıştır.

3.2.5.1. Amilaz Enzimine Ait Son Ürünlerin Saptanması

Hazır olarak alınan plakalar 110-120°C’de inkübatörde 30-60 dk aktive edilmiştir. Fırında aktifleştirilmiş silika plakalara optimum aktivite sıcaklığında bir saat inkübe edilmiş enzim-substrat karışımından 5 µL ve 10 µL plaka üzerine damlatılmıştır. Damlama çapının 3 mm’yi geçmemesine özen gösterilmiştir. Son ürünün doğruluğunu saptamak amacıyla aynı plaka üzerine marker-standart olarak %4 glikoz, maltoz, maltotrioz çözeltilerinden de ilave edilmiştir. Hazırlanan plaka solvent çözeltisine batırılarak (bütanol: asetik asit: distile su 3:1:1) moleküllerin göç etmeleri sağlanmıştır. Bu işlem kapalı ortamda 4-8 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda ürünlerin görünür hale gelebilmesi amacıyla plaka üzerine %20 H₂SO₄ çözeltisi püskürtülmüştür. Bu uygulamanın ardından plakalar 120°C’lik etüve konularak 30 dakika bekletilmiştir (Aygan, 2008; Haliskaranfil, 2012).

3.2.5.2. Selülaz Enzimine Ait Son Ürünlerin Saptanması

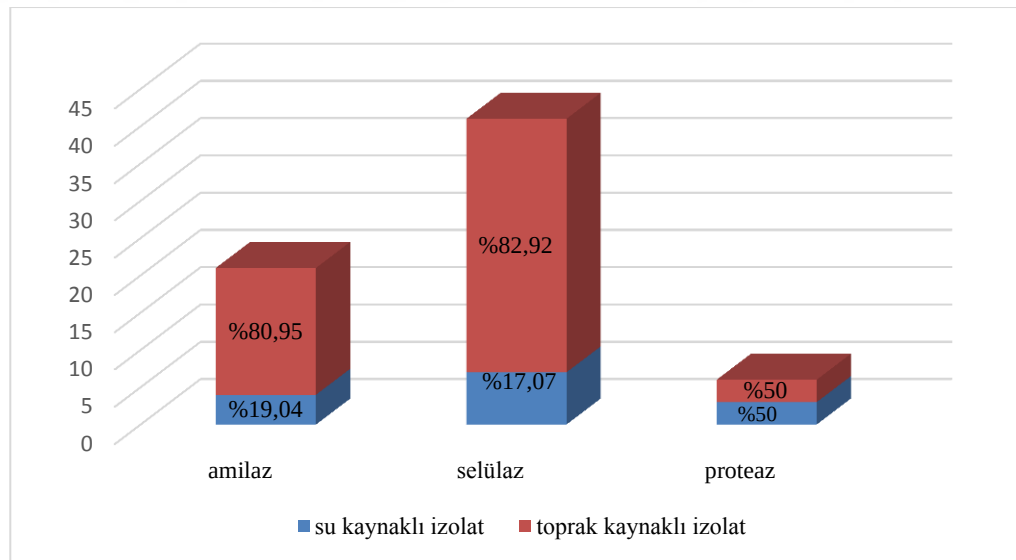
Aktifleştirilen plakalara optimum aktivite sıcaklığında 1 saat bekletilmiş enzim-substrat karışımından 5 ve 10 µl damlatılmıştır. Son ürünün doğruluğunu saptamak amacıyla aynı plaka üzerine marker olarak %4 glikoz, maltoz ve maltotiroz çözeltileri ilave edilmiştir. Hazırlanan plakalar solvent çözeltisine batırılarak (kloroform: asetik asit: distile su 6:7:1) ürünlerin göç etmeleri sağlanmıştır. Yürütme işlemi kapalı ortamda 4-8 saat sürmüştür. Süre sonunda ürünlerin görünür olabilmesi için anilin-difenilamin-ortofosforik asit karışımı jel üzerine püskürtülmüştür. Silika Jel 120°C’ye konularak kuruması beklenilmiştir (Aygan, 2008; Haliskaranfil, 2012).

4. BULGULAR

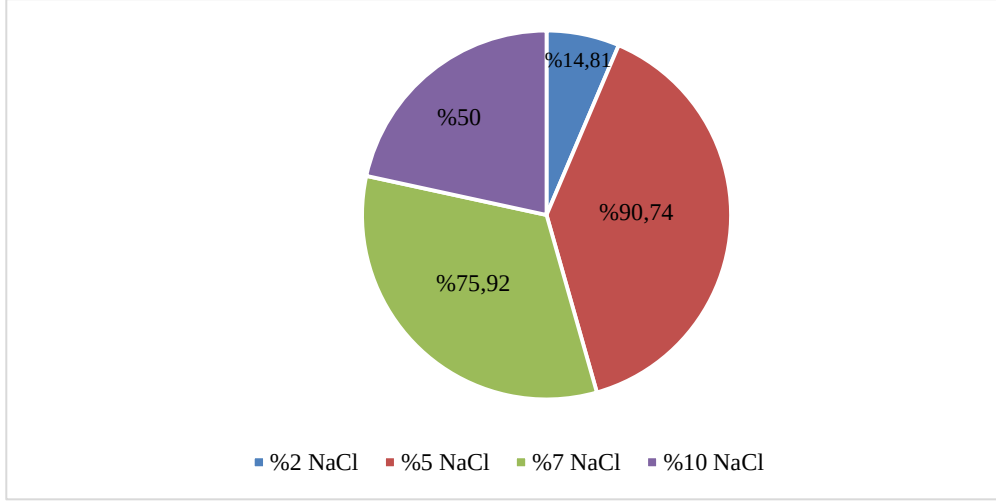
Araştırmada Sinop ilinde farklı bölgelere ait 51 toprak örneğinden 80 ve 14 su örneğinden 46 olmak üzere toplam 126 adet *Bacillus* spp. izolatının karakterizasyonu çeşitli biyokimyasal testler kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca plazmid içerikleri, SDS-PAGE hücre içi toplam protein profilleri, amilaz, selülaz ile proteaz enzim aktiviteleri ile 16S rRNA dizileri belirlenmiştir.

4.1. *Bacillus* spp. İzolatlarının Biyokimyasal Test Sonuçları

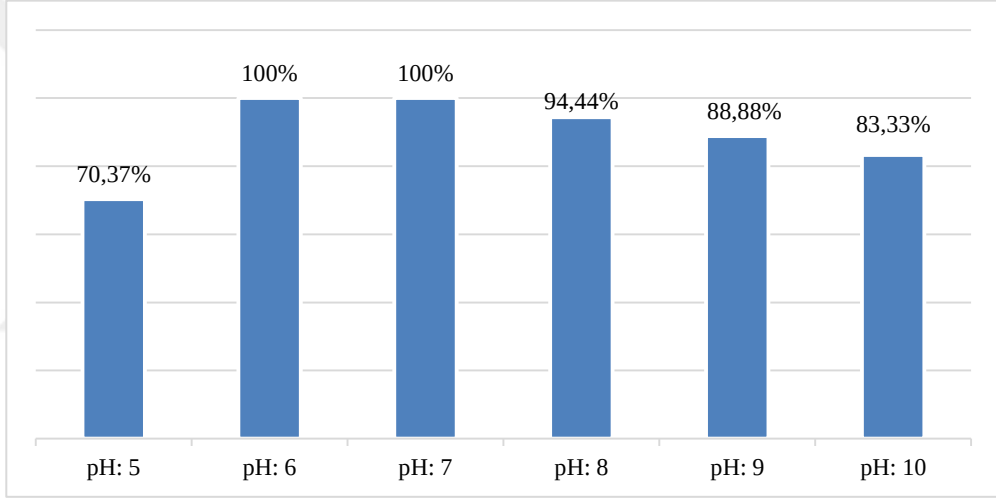
İzole edilen 126 adet *Bacillus* suşuna biyokimyasal testler uygulanmıştır. Uygulanan test sonuçlarına göre izole edilen *Bacillus* suşları Gram-pozitif, çubuk şeklinde, endospor oluşturabilen ve katalaz pozitif olarak belirlenmiştir. Yapılan enzim aktivitesi çalışmalarında toplamda 54 (40 (%50) toprak ve 14 (%30,43) su kökenli) izolatın yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiş ve çalışmaya bu suşlarla devam edilmiştir. Bu suşlara ait biyokimyasal test sonuçları Şekil 4.1-4 ve Çizelge 4.1-4' de verilmiştir.



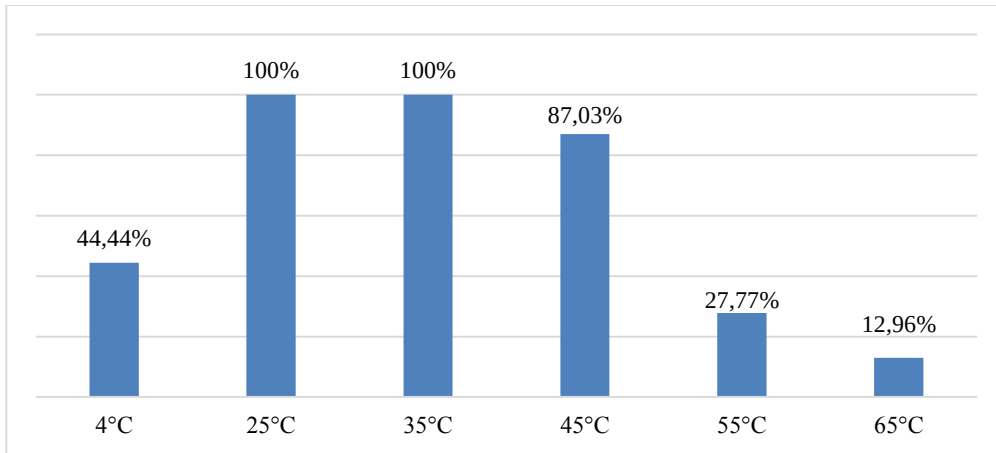
Şekil 4.1. Amilaz, Selülaz ve Proteaz Aktivitesine Sahip *Bacillus* İzolatlarının Oranları



Şekil 4.2. Farklı NaCl Konsantrasyonlarında Gelişme Gösteren *Bacillus* İzolatlarının Oranları



Şekil 4.3. Farklı pH'larda Gelişme Gösteren *Bacillus* İzolatlarının Oranları



Şekil 4.4. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Gösteren *Bacillus* İzolatlarının Oranları

Bazı suşların nitratı nitrite indirgeme yeteneğinin olduğu ve jelatini parçalayabildiği görülmüştür. Yapılan karbonhidrat testlerine göre toprak kökenli suşlarda gaz oluşumu gözlenmediği ve laktozu kullanamadığı, glikoz, maltoz, selüloz, fruktoz, trehaloz, galaktoz, mannoz ve arabinozu bir kısmını kullandığı tespit edilmiştir. Su kökenli suşların ise uygulanan karbonhidratların çoğunluğunu kullandığı bir kısmını kullanamadığı görülmüştür (Çizelge 4.5-4.6).

Çizelge 4.1. Toprak Kökenli *Bacillus* Suşlarının Biyokimyasal Test Sonuçları

Suş No	Gram	Boyama	Spor	Oluşumu	% 2 NaCl	% 5 NaCl	% 7 NaCl	%10 NaCl	pH:5	pH:6	pH:7	pH:8	pH:9	PH:10	Katalaz	Voges	Gaz	Oluşumu	Nitrat	Jelatin
2	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
4	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
7	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
11	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
29	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
33	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
34	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
38	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
39	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
40	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
44	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
45	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
48	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
49	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
50	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
51	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
53	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
54	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
55	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
56	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
57	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
59	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
62	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
63	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
65	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
66	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
67	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
68	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
69	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
70	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
71	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
72	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
74	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
76	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
78	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
79	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
80	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

(-): negatif, (+): pozitif,

Çizelge 4.2. Su Kökenli *Bacillus* Suşlarının Biyokimyasal Test Sonuçları

Suş No	Gram	Boyama	Spor	Oluşumu	%2 NaCl	%5 NaCl	%7 NaCl	%10 NaCl	pH:5	pH:6	pH:7	pH:8	pH:9	PH:10	Katalaz	Voges	Nitrat	Jelatin
S1	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
S18	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S20	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
S23	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S25	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S36	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S39	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S45	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S48	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

(-): negatif, (+): pozitif, (S): Su Kökenli Suşlar

Çizelge 4.3. Su Kökenli *Bacillus* Suşlarının Sıcaklık Test Sonuçları

Bakteri No.	4°C	25°C	37°C	45°C	55°C	65°C
S1	+	+	+	-	-	-
S4	+	+	+	+	+	-
S18	+	+	+	+	-	-
S20	+	+	+	-	-	-
S23	+	+	+	-	-	-
S25	+	+	+	-	-	-
S29	+	+	+	-	-	-
S34	+	+	+	+	+	+
S36	+	+	+	+	-	-
S39	-	+	+	-	-	-
S44	+	+	+	+	-	-
S45	+	+	+	+	+	-
S48	+	+	+	-	-	-
S50	+	+	+	+	+	-

(-): negatif, (+): pozitif

Çizelge 4.4. Toprak Kökenli *Bacillus* Suşlarının Sıcaklık Test Sonuçları

Bakteri No.	4°C	25°C	37°C	45°C	55°C	65°C
2	-	+	+	+	-	-
3	-	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	-	-
7	-	+	+	+	-	-
9	-	+	+	+	-	-
11	-	+	+	+	-	-
12	-	+	+	+	-	-
29	-	+	+	+	+	-
33	+	+	+	+	-	-
34	-	+	+	+	-	-
38	-	+	+	+	+	-
39	-	+	+	+	-	-
40	+	+	+	+	-	-
44	-	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+
48	-	+	+	+	-	-
49	-	+	+	+	+	-
50	+	+	+	+	+	+
51	-	+	+	+	-	-
53	-	+	+	+	-	-
54	+	+	+	+	+	+
55	+	+	+	+	-	-
56	-	+	+	+	-	-
57	-	+	+	+	-	-
59	-	+	+	+	-	-
62	-	+	+	+	+	+
63	-	+	+	+	-	-
65	+	+	+	+	-	-
66	-	+	+	+	-	-
67	+	+	+	+	-	-
68	-	+	+	+	+	+
69	-	+	+	+	-	-
70	+	+	+	+	-	-
71	-	+	+	+	-	-
72	-	+	+	+	-	-
74	-	+	+	+	-	-
76	+	+	+	+	-	-
78	-	+	+	+	-	-
79	-	+	+	+	-	-
80	-	+	+	+	-	-

(-): negatif, (+): pozitif

Çizelge 4.5. Toprak Kökenli *Bacillus* Suşlarının Karbonhidrat Fermantasyon Sonuçları

Suş No	Glikoz	Sükroz	Laktoz	Gaz Oluşumu	Galaktoz	Laktoz	Mannoz	Fruktoz	Trehaloz	Arabinoz	Maltoz
2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
11	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
33	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
34	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
40	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
44	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
45	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
48	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
49	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
50	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
53	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
54	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
56	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
57	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
59	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
62	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
63	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
65	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
67	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
68	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
69	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
71	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
72	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
78	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
79	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
80	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

(-): negatif, (+): pozitif

Çizelge 4.6. Su Kökenli *Bacillus* Suşlarının Karbonhidrat Fermantasyon Test Sonuçları

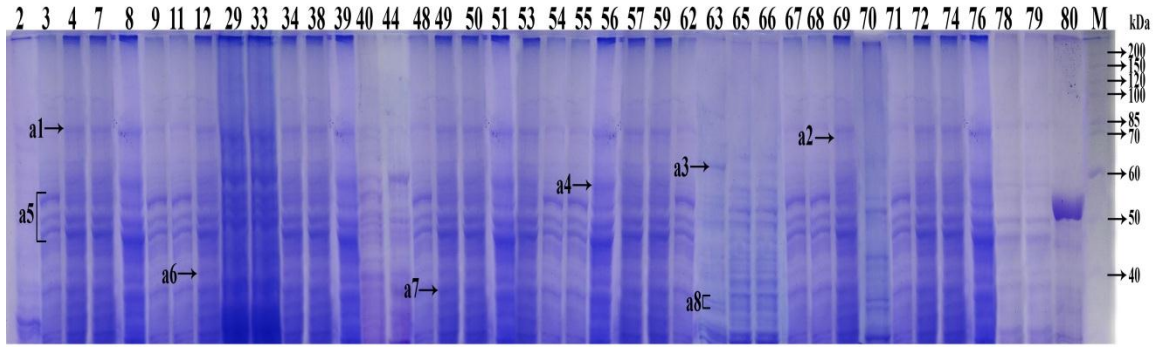
Suş No	Glikoz	Sükroz	Laktoz	Gaz Oluşumu	D-Galaktoz	D-Mannoz	Sükroz	D-Fruktoz	L-Arabinoz	Maltoz	D-Glikoz	D-Mannitol	D-Ksiloz	D-Sorbitol
S1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S18	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S20	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
S23	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
S25	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
S29	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
S34	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
S36	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
S39	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
S44	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
S45	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
S48	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
S50	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-

(-): negatif, (+): pozitif

4.2. *Bacillus* Suşları SDS-PAGE Bulguları

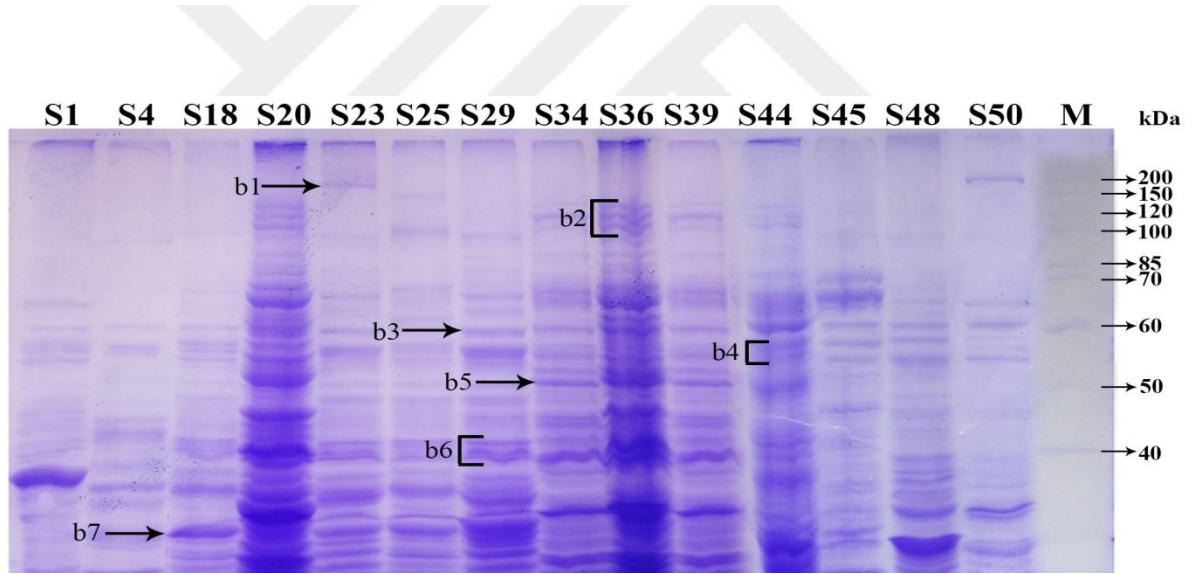
SDS-PAGE yöntemi ile elde edilen toplam hücre protein profillerine göre toplamda 54 suşun yüksek (150-70 kDa) ve düşük (60-40 kDa) molekül ağırlığındaki hücresel protein desenleri arasında benzerlik seviyesinin yüksek olduğu saptanırken toplam hücre protein profillerine göre yapılan nümerik analiz sonucunda ise toprak ve su örneklerinden izole edilen suşların benzerlik düzeyinin 0,63 ve üzerinde iki büyük gruba (A ve B) ayrıldığı görülmüştür (Şekil 4.10).

Topraktan izole edilen bakterilerdeki düşük moleküler ağırlıklı a5 (54,9-48,6 kDa), a6 (41,1 kDa) ve a7 (38,7 kDa) ile işaretlenen proteinlerin tüm suşlarda ortak olduğu belirlenmiştir. Bunun dışında suşlar arasında bazı farklılıkların olduğu gözlemlendi. İncelenen suşlarda yüksek moleküler ağırlıklı a1 (72,3 kDa) ile işaretlenen bandın 63, 65, 66 ve 80 numaralı izolatlarda bulunmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca a2 (69,8 kDa) ile işaretlenen band 4, 7, 12, 34, 38, 69, 74, 76 numaralı suşlarda; a3 (62,4 kDa) ile gösterilen band 49, 50, 51, 53, 57, 59, 63, 65, 66 numaralı suşlarda; a4 (58,7 kDa) ile gösterilen band 4, 7, 8, 12, 29, 33, 34, 38, 39, 40, 44, 49, 50, 51, 53, 56, 57, 59, 65, 66, 72, 74, 76, 78 ve 79 numaralı suşlarda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Toprakta İzole Edilen *Bacillus* spp. SDS-PAGE Toplam Hücre Protein Profilleri

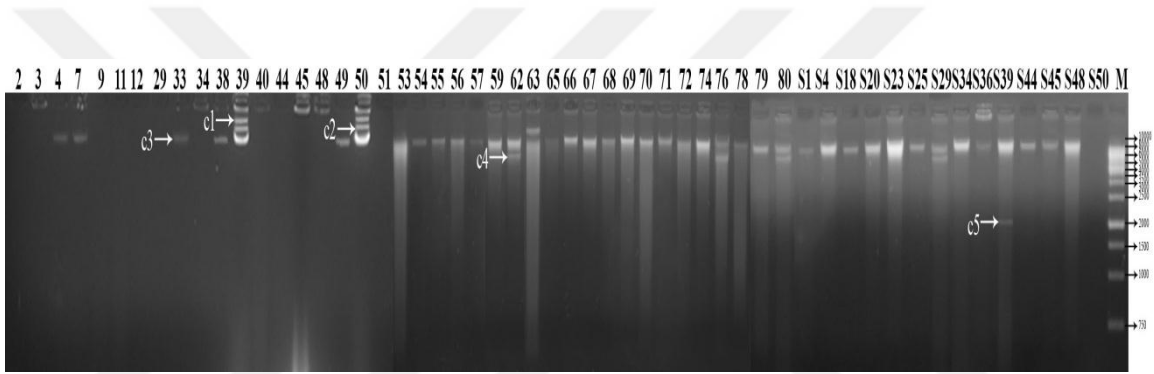
Sudan izole edilen bakterilerdeki düşük moleküler ağırlıklı b3 (59,7 kDa), b4 (58,3-54,6 kDa), b5 (51,4 kDa) ve b7 (33,7 kDa) ile gösterilen bandların tüm suşlarda ortak olduğu belirlenmiştir. Bunun dışında yüksek moleküler ağırlıklı b1 (191,7 kDa) ile gösterilen band S23 ve S50 suşlarında; b2 (139,9-98,4 kDa) ile gösterilen band S20, S34, S36, S39 ve S44 suşlarında; b6 (42,3-38,6 kDa) ile gösterilen band S23, S25, S29, S34 ve S39 suşlarında bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Sudan İzole Edilen *Bacillus* spp. SDS-PAGE Toplam Hücre Protein Profilleri

4.3. *Bacillus* Suşlarının Plazmid DNA Analizi Sonuçları

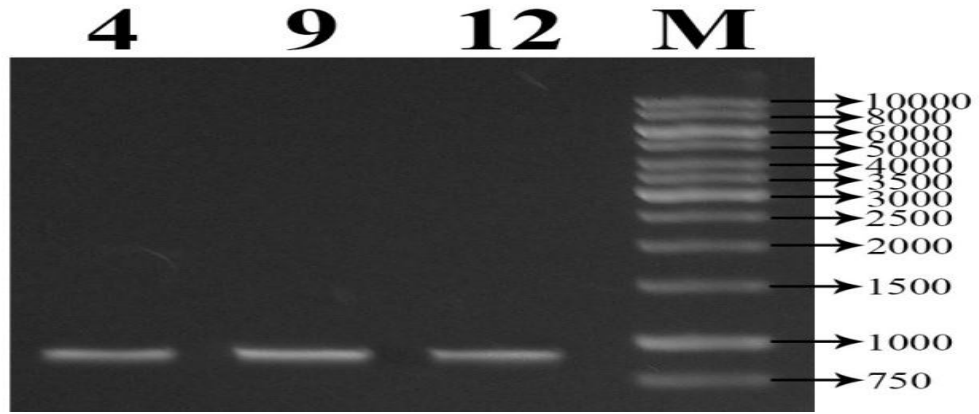
54 adet *Bacillus* spp. suşunda büyüklüğü 20,678 ile 2,156 baz çifti arasında değişen 5 plazmid DNA bandı tespit edilmiştir. (Şekil 4.7). Buna göre c1 (20,678 bç) ile gösterilen plazmidin 39 ve 50 numaralı suşlarda; c2 (16,248 bç) ile gösterilen plazmidin 39, 50 ve 63 numaralı suşlarda; c5 (2,156 bç) ile gösterilen plazmidin S39 nolu suшта olduğu belirlenmiştir. c3 (9,800 bç) ile gösterilen plazmidin topraktan izole edilen 2, 3, 9, 11, 12, 29, 34, 40, 44, 45, 48, 51 ve sudan izole edilen S50 nolu suşlar haricinde diğerlerinde bulunduğu tespit edilmiştir. c4 (5, 862 bç) ile gösterilen plazmidin 62, 76, 80 ve S29 numaralı suşlarda bulunduğu belirlenmiştir. En çok bant sayısı ise 39 ve 50 numaralı suşlarda olduğu gözlenmiştir.



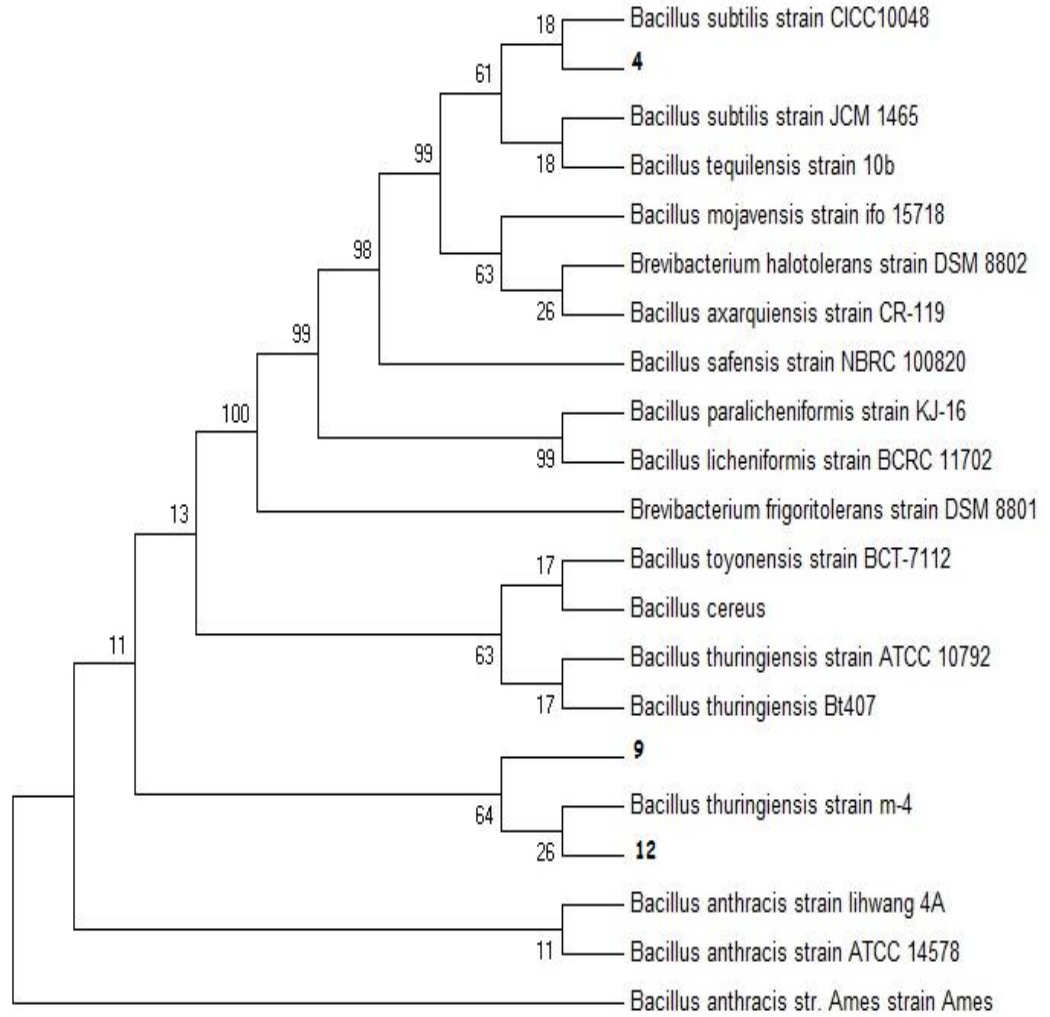
Şekil 4.7. *Bacillus* spp. Plazmid DNA Profilleri

4.4. 16S rRNA Dizi Analiz Sonuçları

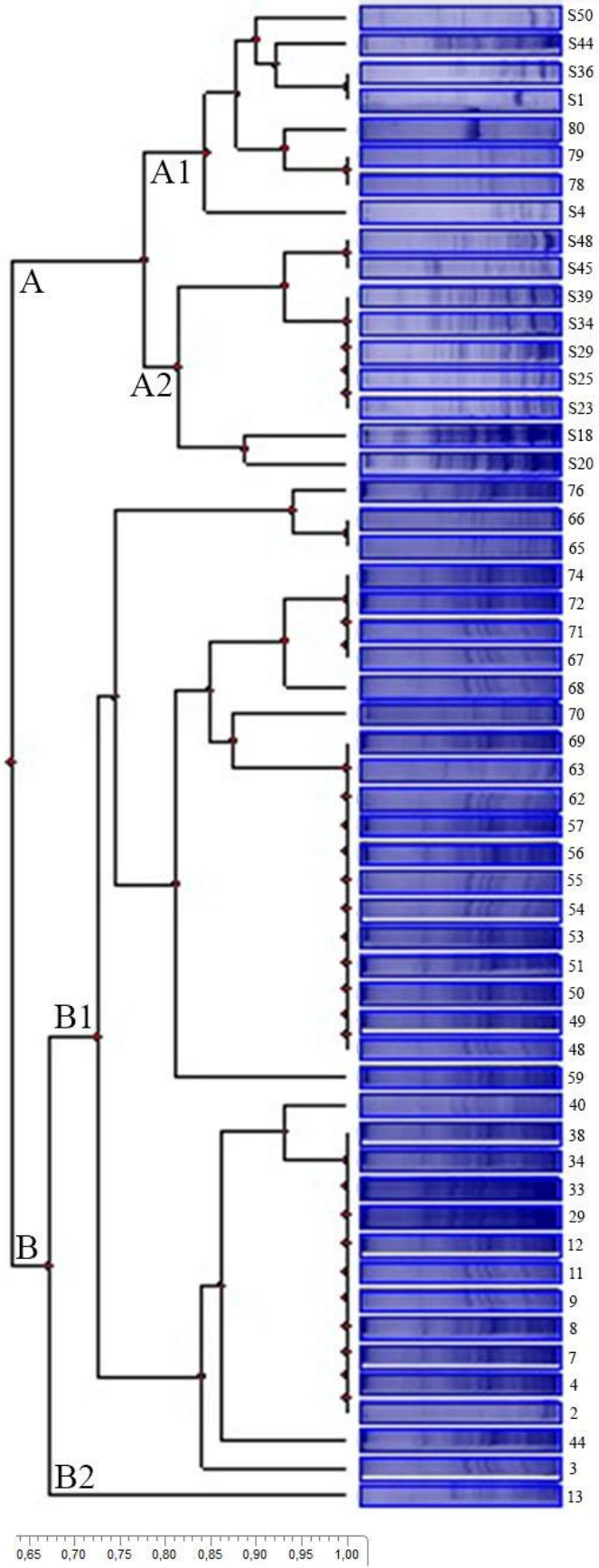
Yüksek enzim aktivitesi gösteren 4, 9 ve 12 suşların 16S rRNA gen bölgesi 519F-1492R oligonükleotit primer çifti kullanılarak PZR'la çoğaltılmıştır. Dizi analizi sonrasında elde edilen sekanslar, yakın ilişkili referans suşların gen sekansları ile gen bankası (NCBI -National Center for Biotechnology Information) veri tabanında BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0) programındaki Clustal W opsiyonuyla hizalamaları yapılan dizilerin bootstrap değeri 1000 olan maximum likelihood (olasılık) metodu kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç üç suşun da *Bacillus* cinsine ait olduğunu, suşlardan, 4 numara suşun *B. subtilis* strain CICC10048, 9 ve 12 numaralı suşların ise *B. thuringiensis* strain m-4 suşuyla yakın ilişkili olduğunu göstermiştir. Ek-8'de 4-9-12 numaralı suşların 16S rRNA dizileri verilmiştir.



Şekil 4.8. *Bacillus* spp. 16S rRNA Jel Görüntüsü



Şekil 4.9. Maksimum Likelihood (olasılık) Metodu ile Moleküler Filogenetik Analiz



Şekil 4.10. Toprak ve Su Örneklerinden İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarının Toplam Hücre Protein Profilleri Dendrogramı

4.5. Amilaz Enzimi İçin Belirlenen Suşların Farklı pH ve Sıcaklık Değerlerinde Üremesi ve Enzim Üretme Sonuçları

Çalışmada 54 suştan 17 tanesi toprak ve 4 tanesi su kökenli olmak üzere toplamda 21 suş amilaz enzim üretimi için ayrılmıştır. Bu suşlar farklı sıcaklık (25°C, 35°C, 45°C ve 55°C) ve farklı pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0) değerlerinde M9 nişasta-katı besiyerinde geliştirilerek üreme ve enzim sentezine ait bulgular Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Toprak ve Su Kökenli Suşların Farklı Sıcaklık ve pH değerlerinde Amilaz Üretimine ait Sonuçlar

25°C için;

Bakteri No.	pH:5		pH:6		pH:7		pH:8		pH:9		pH:10	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
4	8	20	6	13	6	12	8	14	6	7	-	-
29	5	23	6	20	6	20	8	10	7	10	5	-
38	16	18	35	35	4	7	8	15	6	10	-	-
49	15	25	20	25	6	16	7	9	6	14	-	-
50	14	20	5	12	7	17	5	5	6	-	8	-
51	13	24	5	12	8	19	7	11	7	15	-	-
53	9	19	6	15	10	15	6	9	7	-	5	-
54	5	20	10	15	12	20	5	-	5	5	5	-
55	11	18	25	30	4	12	5	-	5	5	5	-
56	5	17	10	20	6	15	7	12	6	12	6	-
57	32	38	5	13	6	14	29	30	7	12	6	-
58	6	17	13	20	7	17	8	14	6	16	-	-
59	10	-	8	8	15	-	5	-	9	-	6	-
66	6	19	4	12	5	14	5	9	6	11	9	-
69	5	10	5	5	6	10	6	9	10	15	9	9
74	5	8	6	6	6	6	5	5	5	5	4	-
78	5	10	5	11	4	11	4	8	4	4	-	-
S18	4	6	8	8	5	11	12	26	5	18	4	10
S20	4	6	6	20	5	16	8	20	4	16	4	12
S25	4	9	5	21	5	21	9	24	6	18	4	18
S36	4	7	7	24	7	21	6	21	5	17	6	17

K: Koloni Çapı (mm), Z: Zon çapı (mm)

35°C için;

Bakteri No.	pH:5		pH:6		pH:7		pH:8		pH:9		pH:10	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
4	16	28	5	14	5	15	7	20	6	16	5	10
29	7	26	7	16	6	17	10	16	10	16	7	-
38	11	28	6	16	5	16	7	17	10	17	5	-
49	10	27	6	17	5	14	8	18	6	20	-	-
50	25	36	6	16	6	14	8	10	8	10	8	-
51	10	26	5	18	5	12	11	19	7	19	-	-
53	13	15	15	18	14	16	9	-	10	-	4	-
54	-	-	7	19	7	15	5	12	7	12	4	-
55	16	23	6	16	6	18	11	16	7	10	6	-
56	7	24	9	23	5	15	6	15	5	15	8	-
57	5	10	6	15	7	13	8	15	6	10	5	-
58	7	13	6	15	9	25	7	16	6	17	-	-
59	13	-	16	-	14	-	10	-	9	-	5	-
66	10	21	5	14	15	22	8	-	6	10	7	-
69	-	-	6	14	12	18	11	17	10	22	6	13
74	5	11	10	-	9	11	7	-	7	9	5	-
78	8	16	5	12	5	14	5	15	5	14	-	-
S18	5	6	9	16	7	12	10	16	6	6	4	-
S20	5	6	6	19	8	15	9	14	6	6	5	-
S25	7	8	8	19	6	14	10	18	8	8	5	5
S36	4	5	5	19	5	16	4	19	5	5	5	5

K: Koloni Çapı (mm), Z: Zon Çapı (mm)

45°C için;

Bakteri No.	pH:5		pH:6		pH:7		pH:8		pH:9		pH:10	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
4	10	18	9	20	7	20	7	21	8	23	8	11
29	8	22	9	-	9	21	8	13	8	14	7	-
38	11	21	9	17	7	16	6	11	6	16	6	-
49	14	24	9	20	10	21	7	15	7	20	-	-
50	15	21	8	20	9	18	8	9	7	12	7	-
51	7	25	8	21	6	16	7	15	7	17	-	-
53	11	13	15	19	15	19	9	-	9	-	5	-
54	9	17	10	20	6	18	7	11	7	12	5	-
55	13	20	10	20	9	20	7	13	7	12	5	-
56	10	24	9	24	8	21	8	14	7	16	7	10
57	8	20	9	20	12	22	8	12	7	13	7	-
58	8	24	7	20	11	19	7	12	5	16	-	-
59	11	-	17	-	17	-	8	-	10	-	6	-
66	5	21	6	17	6	19	5	11	8	10	5	-
69	10	19	9	12	9	16	10	13	12	15	6	10
74	8	-	6	-	6	-	5	-	5	-	-	-
78	7	-	5	-	7	-	7	-	5	-	-	-
S18	9	-	10	14	10	12	9	13	8	12	7	10
S20	5	-	11	12	10	13	9	11	6	8	6	-
S25	9	-	9	-	9	-	8	-	8	-	5	-
S36	8	-	9	13	11	14	10	12	10	11	5	-

K: Koloni Çapı (mm), Z: Zon Çapı (mm)

Koloni ve zon çapları incelendiğinde izole edilen *Bacillus* suşlarının 55°C’de enzim aktivitesi göstermediği toprak örneklerinin amilaz aktivitesinin daha yüksek olduğu özellikle 4 numaralı suşun diğer suşlar arasında daha yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır.

4 numaralı suşun net aktivite zonları pH:5.0’de 8 mm, pH:6.0 11 mm, pH:7.0’de 13 mm, pH:8.0’de 14 mm, pH:9.0’da 15 mm ve pH:10’da 3 mm zon olduğu hesaplanmıştır. Çizelge 4.7 incelendiğinde suşun 15 mm’lik net aktivite zonu ile pH:9 ve 45°C’de en iyi amilaz aktivitesini verdiği görülmüştür.

4.5.1. M9 Nişastalı Agar Besi Yerinde Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Bakteri Üreme Yeteneği ve Enzim Sentezine Ait Sonuçlar

4 numaralı suşun, pH:9.0 ve %3-20 konsantrasyonunda tuz içeren nişastalı besi yerinde 45°C’de 72 saat inkübasyona bırakılarak üreme ve enzim sentezleme yeteneği araştırılmıştır (Çizelge 4.8)

Çizelge 4.8. 4 Numaralı Suşun Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Üreme ve Enzim Sentezine Ait Sonuçlar

Bakteri No.	%3		%5		%7		%10		%13		%15		%20	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
4	8	27	5	10	5	10	5	9	5	9	4	8	3	5

K: Koloni apı(mm), Z: Zon apı(mm)

4 numaralı suş, %3-%20 aralığındaki tuz konsantrasyonunda üreme göstermiştir. Optimum üreme 8 mm çapı ile %3 NaCl içeren ortamda gerçekleşirken %5-13 aralığında üreme 5 mm olarak ölçülmüştür. Tuzluluk oranı arttıkça koloni çapında düşüş gözlenmiştir. Üreyen kolonilerdeki enzim üretimi ise %3-20 aralığında gözlenmiştir. Optimum enzim sentezi 19 mm net aktivite zon çapı ile %3 NaCl içeren ortamda görülmüştür (Şekil 4.11). %5 ve %7 NaCl içeren ortamda net aktivite zon çapı 5 mm, %10, %13 ve %15 NaCl içeren ortamda 4 mm %20 de ise 2 mm net aktivite zon çapı elde edilmiştir.



Şekil 4.11. Amilaz Enziminin %3 NaCl İçeren Ortamda Gelişimi

4.6. Selüloz Enzimi İçin Belirlenen Suşların Farklı pH ve Sıcaklık Değerlerinde Üremesi ve Enzim Üretme Sonuçları

Çalışmada 54 suştan 34 tanesi toprak ve 7 tanesi su kökenli olmak üzere toplamda 41 suş selüloz enzim üretimi için ayrılmıştır. Bu suşlar farklı sıcaklık (25°C, 35°C, 45°C ve 55°C) ve farklı pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0) değerlerinde CMC-Agar besiyeri üzerinde geliştirilerek üreme ve enzim sentezine ait bulgular Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Toprak ve Su Kökenli Suşların Farklı Sıcaklık ve pH Değerlerinde Selüloz Üretimine Ait Sonuçlar

25°C için;

Bakteri No.	pH:5		pH:6		pH:7		pH:8		pH:9		pH:10	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
2	5	10	7	15	7,5	16,5	6	27	5,5	13	-	-
3	6	11	6	14	6	15	16	32	5	11	-	-
4	6	14	7	15	6	16	13	30	6	14	-	-
7	7	12	7	15	6	16	10	30	6	13,5	-	-
12	-	-	6	6	6	8	8	10	5	8	5	-
29	4	11	6	14	5	15,5	8	30	6	11,5	-	-
33	6	13,5	6	15,5	6	16,5	6	31	7	14	-	-
34	6	11	6	14	6	15	8	31	4	12	-	-
38	6	12	6	14	5	15,5	16	30	5	13	-	-
39	5	11	6	14	5	15	8	33	4,5	8	-	-
40	-	-	7	16	7,5	17,5	12	21	7	14	11	-
44	6	13	6	13	8	16	13	26	5	10,5	4	-
48	-	-	8	15	8	16	15	20	7	14,5	7	14
49	6	15	6	16	6	17	13	30	7	13,5	-	-
50	5	8	6	14	6,5	17	5	26	5,5	12,5	-	-
51	6	14	6	14	6	16,5	5	30	6	13	-	-
53	-	-	7	15	8	17	11	23	6	13	10	20
54	5	7,5	7	16	7	17	5	27	5	11,5	-	-
58	5	11	7	14	6,5	15	6	28	6	13	-	-
59	3	6	8	14	7,5	14,5	15	16	6	11,5	7	10
62	-	-	8	8	6,5	8,5	7	10	6	7,5	5	9
63	-	-	7	12	8	14	7	14	7	13	6	14
65	5	7	7	13	5	14,5	6	25	4	10,5	-	-
66	6	11	7	14	6	14	5	29	6	11,5	-	-
67	5	10	5	13	5	15	5	27	5	12,5	-	-
68	6	21	7	28	6	21	5	25	6	29	-	-
69	5	12	6	15,5	7,5	16	7	14	6	12,5	-	-
70	4	10	8	16	7	16	6	10	5,5	9	-	-
71	-	-	6	8	7	11,5	6	12	6	12,5	5	15
74	-	-	8	12	5	9	5	10	9	13	6	10
76	-	-	10	24	4	7	9	22	10	21	10	20
78	8	25	5	19	6	15	5	10	-	-	-	-
79	-	-	7	12	8	15	7	13	6	11,5	10	16
80	-	-	8	14	9	15	6,5	10	6,5	11	5	13
S1	8	19	10	20	10	20	8	18	9	19	10	19
S4	-	-	6	17	6	19	5	16	7	14	5	12
S34	6	23	14	28	12	25	6	25	7	24	6	21
S39	5	19	7	20	6	29	5	18	8	18	5	18
S44	5	10	7	11	6	8	6	12	6	10	7	8
S45	13	28	12	29	11	29	11	29	10	27	9	22
S48	3	5	13	28	12	28	10	23	9	24	9	20

35°C için;

Bakteri No.	pH:5		pH:6		pH:7		pH:8		pH:9		pH:10	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
2	23	27	23	29	16	26	10	27	6	20	6	12
3	30	35	30	37	17	27,5	8	24	-	-	6	10
4	23	26	32	36	21	28	6	27	17	26	6	8
7	11	21	26	37	21	29	8	29	12	25	10	12
12	-	-	21	36	9	15	8	11	6	9	6	8
29	12	15	35	45	7	24	9	27	6	21	10	12
33	15	23	33	38	18	25	8	27	14	25	10	15
34	7	24	26	35	15	30	8	28	19	40	10	12
38	17	25	28	36	32	46	7	27	20	30	5	-
39	21	26	24	30	23	29	14	34	18	28	8	-
40	3	-	5	16	15	18	11	22	15	16	11	12
44	15	20	10	16	8	15	14	23	13	23	8	16
48	3	5	-	-	16	17	7	18	15	15	8	10
49	16	24	40	43	50	57	9	29	21	28	9	11
50	14	22	23	31	15	30	8	28	6	21	6	13
51	15	24	32	37	16	28	8	28	6	20	-	-
53	-	-	17	20	15	16	12	13	13	15	9	10
54	6	18	16	31	23	37	24	40	15	29	10	18
58	29	31	47	53	6	22	9	27	-	-	-	-
59	-	-	15	19	11	14	12	17	8	22	8	9
62	3	-	9	11	5	7	7	8	7	9	8	-
63	5	-	8	13	7	9	7	9	6	10	10	-
65	3	6	16	22	11	21	6	23	6	18	7	11
66	16	23	8	26	19	35	8	27	9	22	12	17
67	6	24	6	21	26	40	5	22	5	18	4	11
68	5	10	8	35	8	30	8	17	5	13	-	-
69	6	24	30	36	24	32	-	-	4	17	5	17
70	28	33	9	26	7	23	9	26	20	52	11	25
71	3	-	10	16	10	17	10	16	9	20	14	22
74	4	?	12	15	5	6	6	7	7	9	5	-
76	9	21	12	14	11	13	10	12	10	12	7	8
78	26	30	6	22	10	26	15	30	15	25	-	-
79	3	-	12	17	12	18	10	16	12	18	9	16
80	-	-	9	19	9	16	11	17	7	14	9	-
S1	-	-	19	20	18	20	12	14	13	14	14	15
S4	-	-	5	22	6	20	6	21	6	20	6	16
S34	27	37	19	35	25	47	7	30	7	25	6	23
S39	6	15	6	18	10	18	7	12	7	12	7	11
S44	13	29	14	30	13	29	9	24	14	25	11	22
S45	16	35	18	35	20	35	18	28	15	34	13	32
S48	17	30	19	34	21	37	13	32	12	30	11	26

45°C için,

Bakteri No.	pH:5		pH:6		pH:7		pH:8		pH:9		pH:10	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
2	27	30	30	38	19	35	15	28	9	22	-	-
3	12	24	34	40	13	25	10	26	10	24	-	-
4	24	26	24	31	16	26	10	27	-	-	-	-
7	24	25	26	30	12	33	12	26	5	10	-	-
12	-	-	10	17	24	27	24	34	7	12	7	15
29	-	-	21	26	14	21	8	20	13	17	-	-
33	25	30	27	33	13	32	10	28	12	27	-	-
34	13	24	28	33	22	36	30	38	20	30	9	15
38	18	27	22	30	18	34	11	27	11	24	-	-
39	17	28	20	30	20	34	11	29	14	27	-	-
40	-	-	-	-	10	25	8	15	-	-	-	-
44	-	-	30	37	21	35	25	32	21	27	9	16
48	-	-	6	8	9	15	12	15	4	5	-	-
49	13	23	13	27	13	28	8	32	6	22	-	-
50	16	23	10	26	13	19	8	17	7	14	-	-
51	10	21	9	24	9	23	10	32	9	25	-	-
53	-	-	4	4	5	?	-	-	-	-	-	-
54	14	25	12	21	11	21	14	21	7	14	-	-
58	18	25	18	34	16	34	9	27	13	27	-	-
59	-	-	24	35	21	32	20	31	10	15	-	-
62	-	-	6	8	9	11	6	7	3	5	6	-
63	-	-	22	30	21	29	15	27	5	7	4	5
65	12	15	26	28	13	16	-	-	-	-	-	-
66	8	11	22	25	15	20	11	13	5	8	-	-
67	13	19	8	15	12	18	10	12	7	11	6	10
68	-	-	11	16	10	14	8	10	-	-	-	-
69	28	34	25	33	17	26	20	34	5	16	8	12
70	29	31	26	39	19	29	28	41	6	16	8	10
71	-	-	16	27	25	31	19	35	9	15	8	14
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	-	7	9	8	10	6	8	-	-	-	-	-
78	8	19	8	20	7	19	14	28	6	16	-	-
79	-	-	10	15,5	13	19	22	42	9	15	5	11,5
80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1	-	-	15	18	15	19	9	17	14	19	11	14
S4	-	-	7	20	7	20	4	16	6	19	4	10
S34	9	30	9	30	14	33	5	27	8	25	9	22
S39	6	17	6	17	7	20	6	12	6	15	6	14
S44	6	15	10	21	13	20	5	16	8	16	5	14
S45	9	17	11	18	11	21	8	17	8	15	6	15
S48	5	16	15	30	14	25	10	25	12	25	7	25

55°C için;

Bakteri No.	pH:5		pH:6		pH:7		pH:8		pH:9		pH:10	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
2	10	18	10	19	8	17	9	14	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	5	9	6	13	6	14	-	-	-	-	-	-
12	-	-	11	22	11	19	7	20	9	15	5	10
29	-	-	-	-	6	14	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	6	11	-	-	-	-	-	-
34	-	-	18	28	12	18	10	20	7	12	-	-
38	-	-	-	-	5	13	-	-	-	-	-	-
39	-	-	7	12	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	4	6	-	-	-	-	-	-	-	-
44	3	8	14	28	8	22	11	22	7	15	6	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	5	10	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	9	16	-	-	5	-	-	-
62	-	-	-	-	5	6	-	-	-	-	-	-
63	-	-	7	-	10	16	9	16	-	-	-	-
65	-	-	7	11	6	15	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	5	12	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	6	10	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	5	8	5	8	-	-	-	-
69	-	-	-	-	5	12	4	10	-	-	-	-
70	-	-	7	15	4	10	5	10	-	-	-	-
71	-	-	12	17	12	17	10	16	6	11	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	-	-	-	-	8	13	10	14	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S45	-	-	6	13	10	15	7	10	6	10	-	-
S48	-	-	6	14	8	11	5	8	5	7	4	-

Veriler incelendiğinde 12 numaralı suşun geniş sıcaklık aralığında ve yüksek pH'da gelişme gösterdiği gözlenmiştir. Enzimin 55°C'deki net aktivite zonu pH:6.0'da 11 mm, pH:7.0'de 8 mm, pH:8'de 13 mm, pH:9.0'da 6 mm ve pH:10.0'da 5 mm olarak ölçülmüştür. Tablo incelendiğinde 12 numaralı suşun pH:8'de 13 mm'lik net aktivite zonu ile 55°C'de en iyi selüloz aktivitesini verdiği görülmüştür.

4.6.1. CMC-Agar Besi Yerinde Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Bakteri Üreme Yeteneği ve Enzim Sentezine Ait Sonuçlar

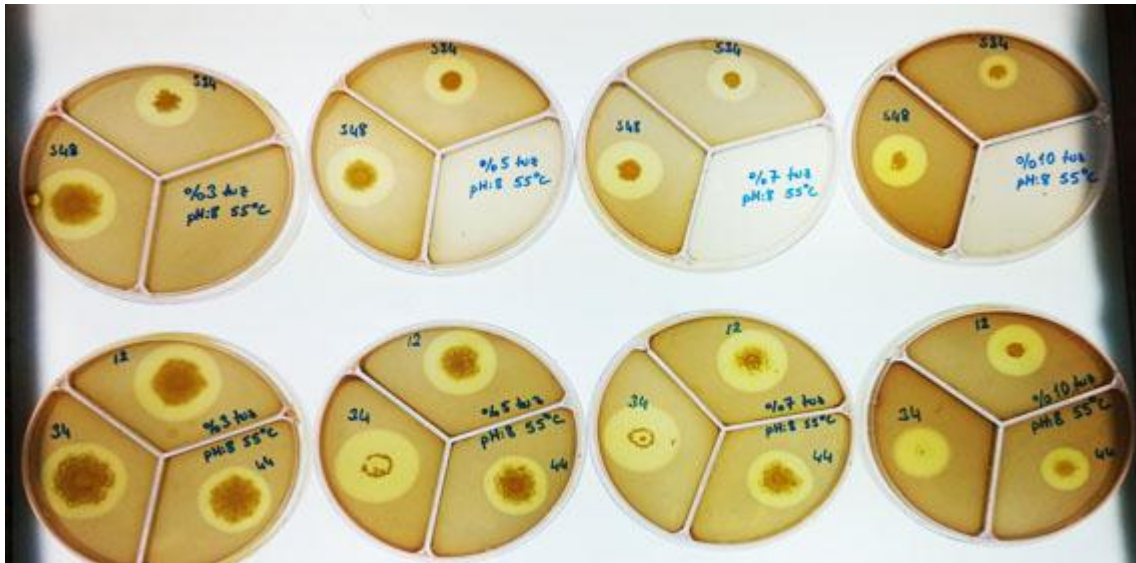
12 numaralı suş; pH:8.0 ve %3-20 konsantrasyonunda tuz içeren CMC'li besi yerinde (Şekil 4.12) 55°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak üreme ve enzim sentezleme yeteneği araştırılmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. 12 Numaralı Suşun Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Üreme ve Enzim Sentezine Ait Sonuçlar

Bakteri No.	%3		%5		%7		%10		%13		%15		%20	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
12	19	28	14	24	13	24	7	20	5	10	-	-	-	-

K: Koloni Çapı(mm), Z: Hidroliz Zon Çapı(mm)

12 numaralı suş, %3-13 aralığındaki tuz konsantrasyonunda üreme göstermiştir. Optimum üreme 19 mm çapı ile %3 NaCl içeren ortamda gerçekleşmiştir. Tuzluluk oranı arttıkça koloni çapında düşüş gözlenmiştir. Üreyen kolonilerdeki enzim üretimi ise %3-13 aralığında gözlenmiştir. Optimum enzim sentezi 13 mm net aktivite zon çapı ile %10 NaCl içeren ortamda görülmüştür. %5 NaCl içeren ortamda 10 mm, %7 NaCl içeren ortamda 9 mm, %10'da 13 mm, %13'de 5 mm net aktivite zonu elde edilmiştir. %15 ve %20 NaCl içeren ortamda bakteri gelişimi ve enzim sentezi gerçekleşmemiştir.



Şekil 4.12. Selüloz Enziminin pH:8'de %3-10 Tuz Oranlarında Oluşturduğu Zon Çapları

4.7. Proteaz Enzimi İçin Belirlenen Suşların Farklı pH ve Sıcaklık Değerlerinde Üremesi ve Enzim Üretme Sonuçları

Çalışmada 54 suştan 3 tanesi toprak ve 3 tanesi su kökenli olmak üzere toplamda 6 suş proteaz enzim üretimi için ayrılmıştır. Bu suşlar farklı sıcaklık (25°C, 35°C, 45°C ve 55°C) ve farklı pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0,10.0) değerlerinde skimmilk-Agar besi yerinde geliştirilerek üreme ve enzim sentezlerine ait bulgular Çizelge 4.11’de gösterilmiştir (Şekil 4.13).

Çizelge 4.11. Toprak ve Su Kökenli Suşların Farklı Sıcaklık ve pH Değerlerinde Proteaz Üretimine Ait Sonuçlar

25°C için;

Bakteri No.	pH:5		pH:6		pH:7		pH:8		pH:9		pH:10	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
9	10	15	12	17	15	22	15	23	13	19	8	13
11	8	12	10	15	11	18	13	20	10	17	7	11
45	11	21	13	26	15	20	15	21	12	19	10	17
S23	13	17	18	21	19	23	15	21	15	20	11	18
S29	11	18	16	19	16	20	18	22	12	20	11	16
S50	12	-	21	25	18	-	9	11	9	11	-	-

35°C için;

Bakteri No.	pH:5		pH:6		pH:7		pH:8		pH:9		pH:10	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
9	12	21	13	21	14	18	16	19	15	24	11	18
11	7	13	9	15	11	19	13	21	11	15	9	13
45	11	21	20	26	20	27	16	21	13	18	9	12
S23	12	21	8	25	10	18	10	14	12	17	16	20
S29	14	20	15	22	15	23	18	21	20	23	10	16
S50	7	12	8	15	13	22	15	18	10	17	8	12

45°C için;

Bakteri No.	pH:5		pH:6		pH:7		pH:8		pH:9		pH:10	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
9	7	14	11	21	15	25	17	28	15	27	8	15
11	10	19	7	9	7	10	10	13	10	14	9	13
45	13	20	15	20	16	21	18	22	10	14	17	24
S23	5	-	5	-	7	-	6	-	4	-	4	-
S29	5	-	6	-	8	-	7	-	5	-	4	-
S50	5	7	5	8	6	9	8	9	9	11	7	9

Toprak ve su kökenli suşların 55°C’de bakteri gelişimini ve proteaz enzim üretimini gerçekleştirmediği görülmüştür. Maximum aktiviteyi veren bakterinin 9 numaralı suş olduğu ve bu suşun pH:5.0-10.0 aralığında gelişme gösterdiği ve enzim sentezlediği tespit edilmiştir. Çizelge 4.11 incelendiğinde 45°C’de pH:5.0’de 7 mm, pH:6.0’da 10 mm, pH:7.0’de 10 mm, pH:8.0’de 11 mm, pH:9.0’da 12 mm ve pH:10.0’da 7 mm’lik net aktivite zon çapı hesaplanmıştır. Proteaz aktivitesi için 9 numaralı suşun 45°C’de pH:9.0’da 12 mm net aktivite zon çapı ile en iyi aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.13. Skimmilk-Agarda Suşların Zon Görünümleri

4.7.1. Skimmilk-Agar Besi Yerinde Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Bakteri Üreme Yeteneği ve Enzim Sentezine Ait Sonuçlar

9 numaralı suş; pH:9.0 ve %3-20 konsantrasyonunda tuz içeren skimmilk besiyerinde 45°C’de 24 saat inkübasyona bırakılarak üreme ve enzim sentezleme yeteneği araştırılmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. 9 Numaralı Suşun Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Üreme ve Enzim Sentezine Ait Sonuçlar

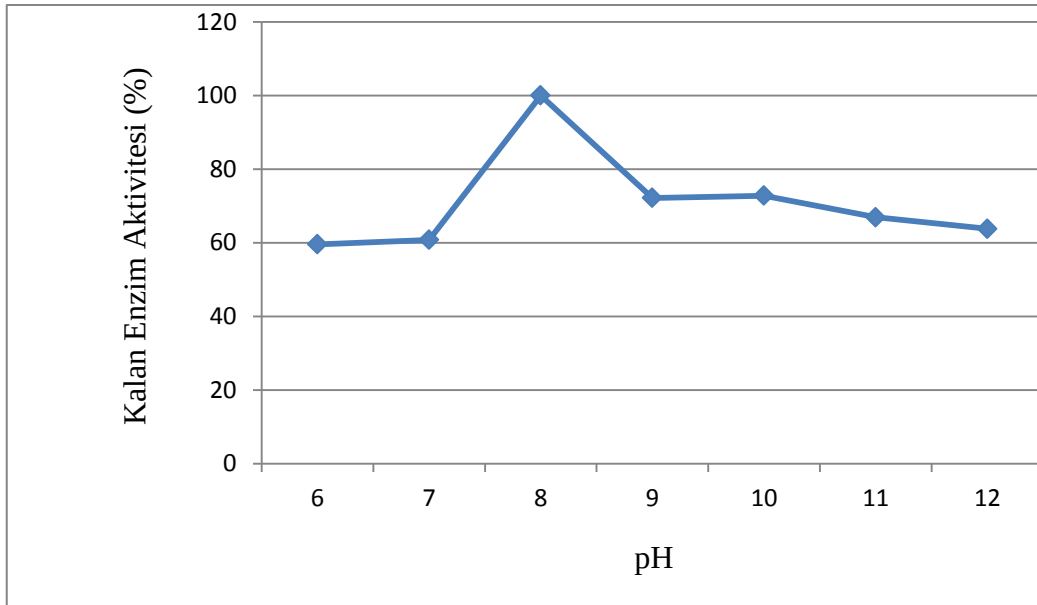
Bakteri No.	%3		%5		%7		%10		%13		%15		%20	
	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
9	7	-	11	-	10	-	10	-	6	-	5	-	5	-

K: Koloni Çapı (mm), Z: Hidroliz Zon Çapı (mm), (-) : Zon oluşumu gözlenmedi

9 numaralı suşun 45°C’de %3-20 NaCl aralığında gelişim gösterdiği ancak enzim aktivite zonu oluşturmadığı görülmüştür.

4.8. 4 Numaralı Suştan Saflaştırılan Amilaz Enziminin Optimum pH Aralığı

4 numaralı suştan saflaştırılan amilaz enzimi kullanılarak Na-Fosfat (pH:6.5-8.0), Glisin-NaOH (pH:8.5-10.0) ve Boraks-NaOH (pH:10.5-12.5) tampon sistemleri ile aktivite analizleri yapılmıştır (Şekil 4.14). *Bacillus* sp. 4 suşunun kısmi saflaştırılmasıyla elde edilen amilaz enzimi optimum aktivitesini pH:8.0'de göstermiştir. Optimum aktivitenin gözlemlendiği pH değerinin üzerindeki pH değerlerinde aktivitede düşüş yaşanmıştır. Enzim, analiz edilen tüm pH değerleri dikkate alındığı zaman ortalama %70,86 aktivite göstermiştir

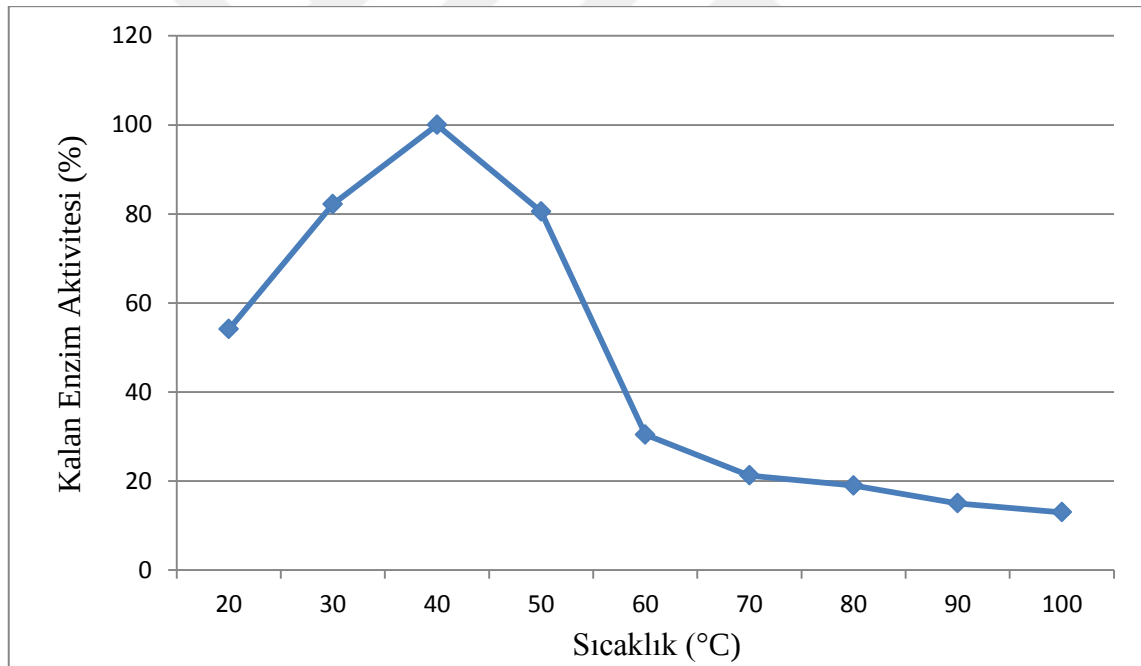


Şekil 4.14. 4 numaralı Suştan Elde Edilen Amilaz Enziminin Optimum pH'sı

4.8.1. 4 Numaralı Suştan Saflaştırılan Amilaz Enziminin Optimum Sıcaklık Aktivitesi

4 numaralı suşa ait amilaz enziminin en yüksek aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması amacıyla optimum aktivitenin gerçekleştiği pH:8.0 değerinde 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100°C aralığında aktivite analizleri yapılmıştır (Şekil 4.15). Aktivite tayininde inkübasyon süresi 30 dakika olarak seçilmiştir.

4 numaralı suştan izole edilen amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 40°C olduğu tespit edilmiştir. Optimum sıcaklık değerinin üzerindeki sıcaklık değerlerinde hızlı düşüşler gözlenmiştir. Amilaz enzimi test edilen 20-50°C aralığında ortalama %79,21 aktivite gösterdiği, 60-100°C aralığında ortalama aktivitesinin %19,73 olarak hesaplanmıştır. Analizler sonucunda 4 numaralı suştan izole edilen amilaz enzimin 20-50°C aralığında yüksek aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

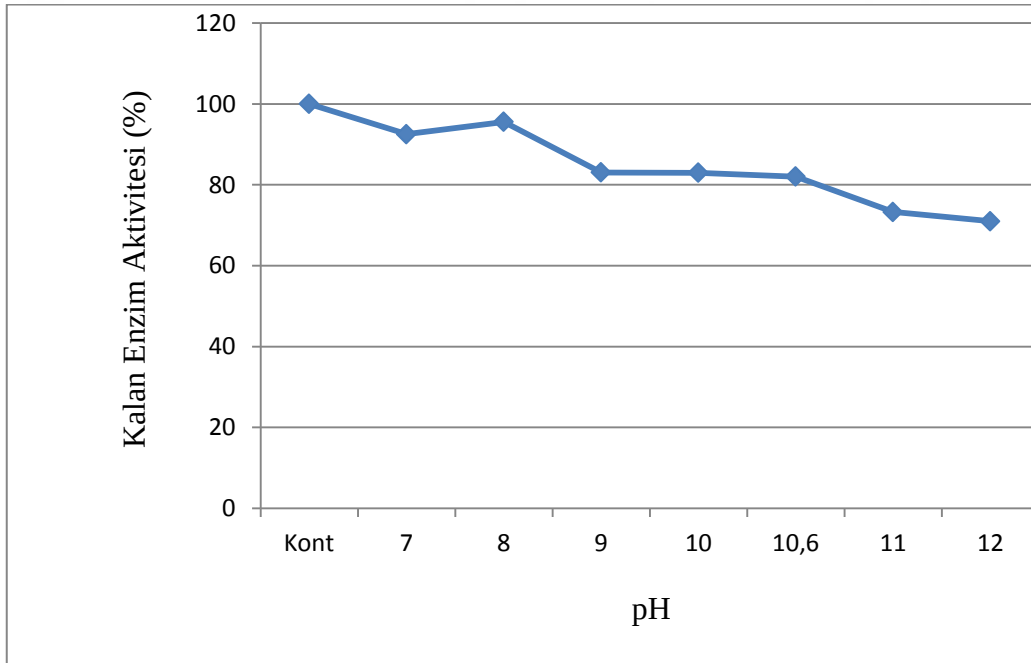


Şekil 4.15. 4 numaralı Suştan Amilaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerleri

4.8.2. 4 Numaralı Suşun Amilaz Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi

4 numaralı suşun amilaz enzimi pH:7.0; 8.0; 9.0; 10.0; 10.6; 11.0; 12.0 ve 40°C'de 42 saat ön inkübasyona tabi tutarak enzimin farklı pH değerlerindeki stabilitesi incelenmiştir. Aktivitenin belirlenmesi için enzim, optimum pH değerinde hazırlanmış substrat kullanılarak optimum aktivite sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Analiz sonuçları şekil 4.16'de gösterilmiştir.

Enzim tüm pH değerlerinde ortalama %82,92 aktivite sağlayarak stabil kalmıştır. Bu sonuçlar enzimin geniş pH aralığında 42 saat süreyle yüksek düzeyde stabil kaldığını göstermektedir.

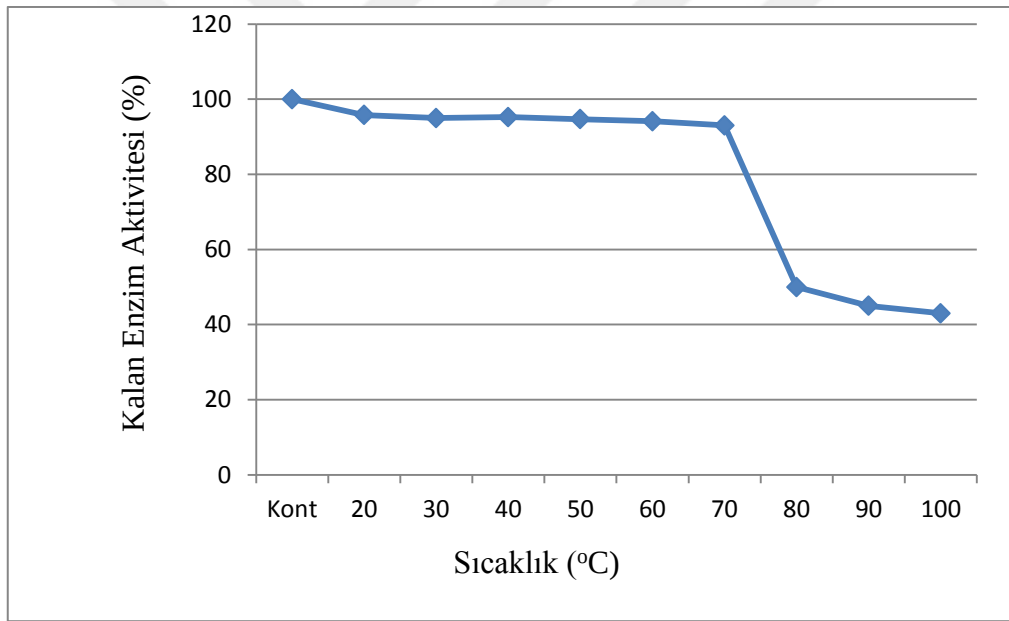


Şekil 4.16. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enziminin pH Stabilitesi

4.8.3. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enziminin Termal Stabilitesine Ait Bulgular

4 numaralı suşun amilaz enziminin termal stabilitesinin saptanması amacıyla 20-100°C aralığında 30 dakika süreyle ön inkübasyon yapıldıktan sonra optimum aktivite sıcaklığı ve pH değerinde hazırlanmış substrat ile gerçekleştirilen analiz sonuçları şekil 4.17’de gösterilmiştir.

Enzim ön inkübasyon gerçekleştirilen tüm sıcaklık değerlerinde (20-100°C) yaklaşık %78,44 oranında orijinal aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir. Sıcaklık değerleri incelendiğinde 20-70°C aralığında %94,66; 80-100°C aralığında ise %46 stabil kalmıştır. Bu durum, enzimin 70°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda stabilitesinde düşüşler olduğunu göstermiştir.

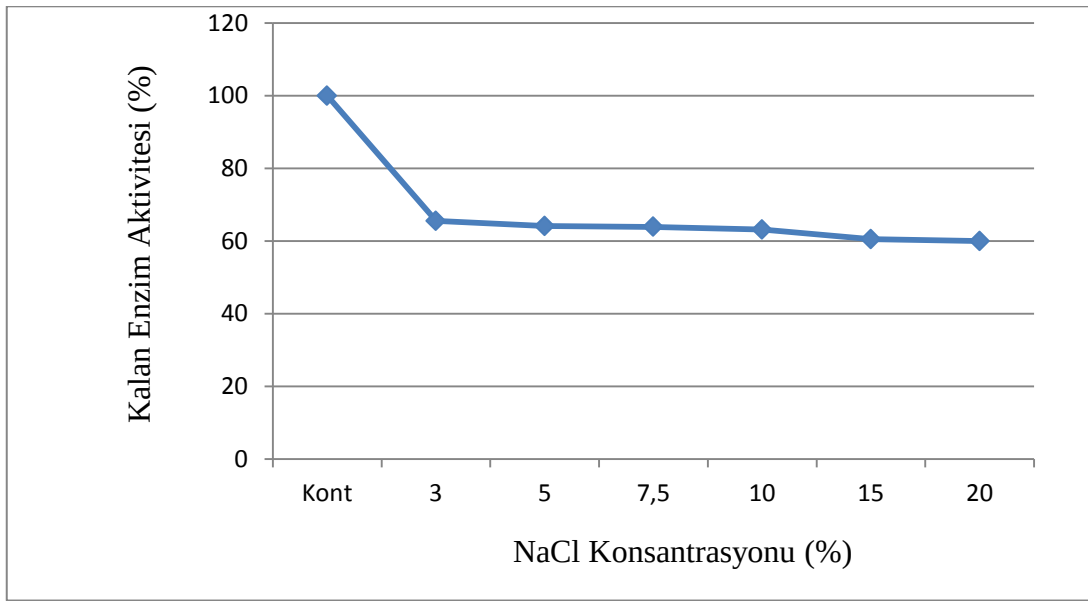


Şekil 4.17. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enziminin Termal Stabilitesi

4.8.4. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enzim Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisi

Amilaz enzim aktivitesi üzerine NaCl'nin etkisini belirlemek için %3; %5; %7.5; %10; %15 ve %20 NaCl konsantrasyonlarında 60 dakika süreyle 40°C'de ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Optimum aktivite ve pH değerinde gerçekleştirilen analiz sonuçlarına ait bulgular şekil 4.18'de verilmiştir.

En yüksek enzim aktivitesi %65,53 ile %3 NaCl konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Enzim tüm konsantrasyonlarda ortalama %62,86 oranında stabil kalmıştır.

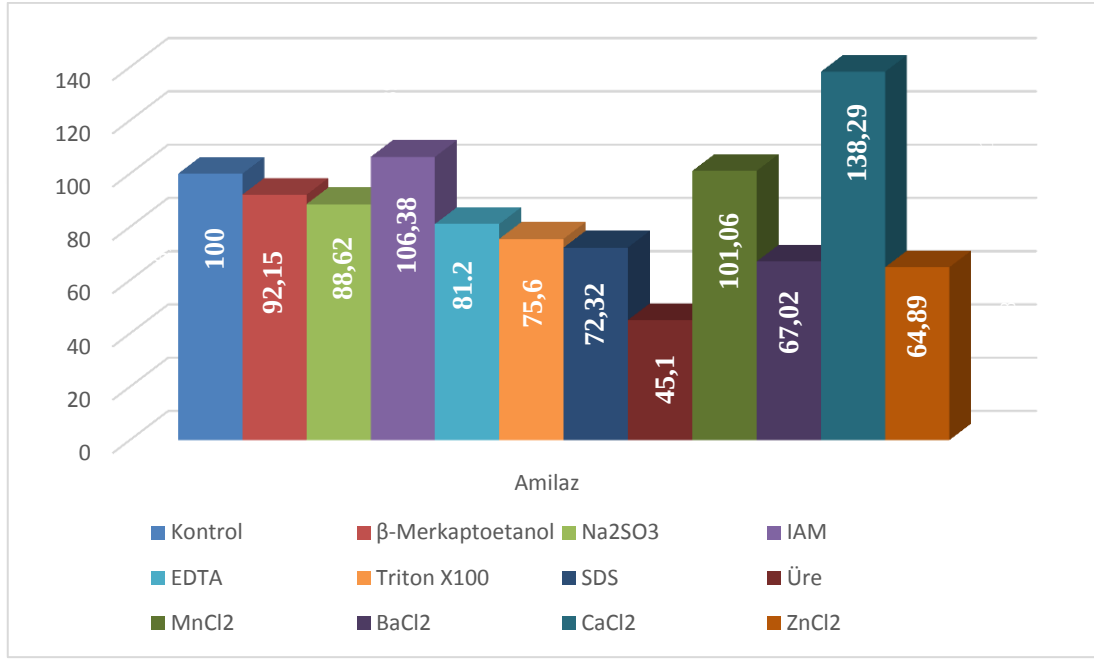


Şekil 4.18. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enzim Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisi

4.8.5. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enzimi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi

Amilaz enziminin; farklı inhibitör, metal iyonu, şelatör, deterjan ve oksidanlarla 40°C’de 60 dakika inkübe edildikten sonra aktivite tayini yapılarak enzim aktivitesi saptanmıştır (Şekil 4.19).

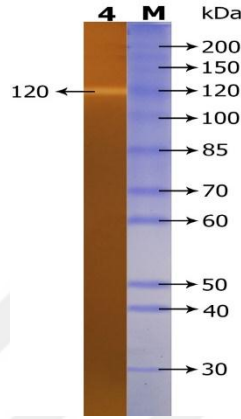
Enzim aktiviteleri kontrole göre 5 mM %6,38, 5 mM $MnCl_2$ ’de %1,06; 5 mM $CaCl_2$ ’de %38,29 oranında arttığı saptanmıştır.



Şekil 4.19. Enzim Üzerine İnhibitörlerin Etkisi

4.8.6. 4 Numaralı Suşun SDS-PAGE ve Zimogram Analizi

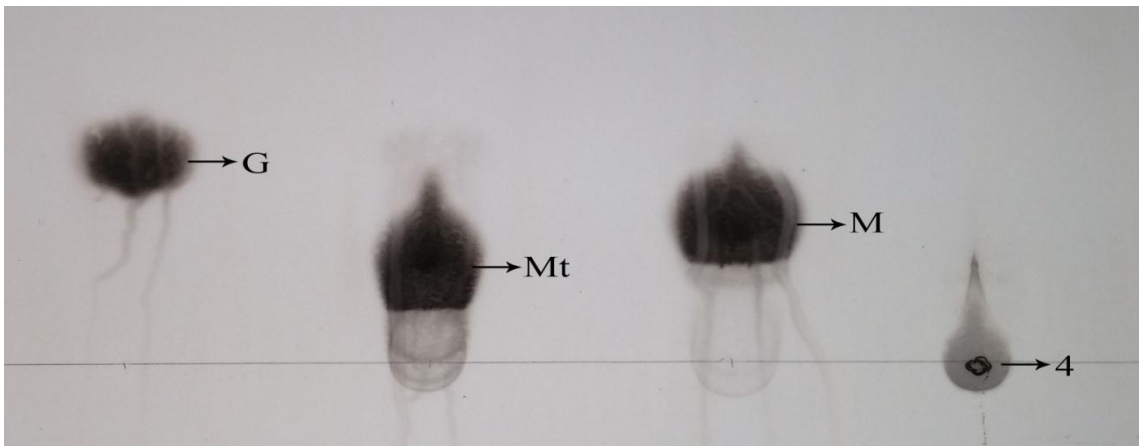
Amilaz enzimi %12'lik SDS-PAGE sisteminde analiz edilerek enzime ait aktivite bölgeleri saptanmıştır. Zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlığı 120 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. *Bacillus* sp. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enziminin Moleküler Ağırlığı ve Zimogram Analizi (M:Marker)

4.8.7. 4 Numaralı Suşun Amilaz Enzimine Ait İnce Tabaka Kromatografisi Bulguları

Bacillus sp. 4 suşunun amilaz enziminin optimum aktivite sıcaklığı ve pH değerinde nişastayı parçalaması sonucu ince tabaka kromatografisinde elde edilen hidroliz ürünleri şekil 4.21'de verilmiştir. İnce tabaka kromatografisi analizi sonucunda, *Bacillus* sp. 4 suşunun amilaz enziminin nişastayı maltoz ve maltotrioza parçaladığı saptanmıştır.

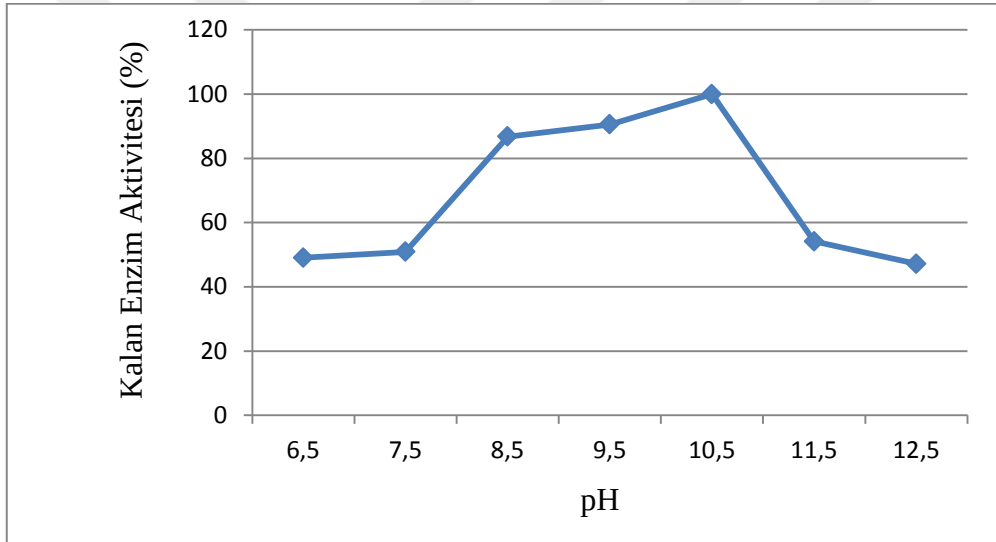


Şekil 4.21. *Bacillus* sp. 4 Suşunun Amilaz Enziminin İnce Tabaka Kromatografisi İle Son Ürünlerinin Belirlenmesi (G: Glikoz, Mt: Maltotrioz, M: Maltoz)

4.9. 12 Numaralı *Bacillus* sp. Suşunun Selüloz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerine Ait Sonuçlar

12 numaralı suşun enzimi üç farklı tampon sistemi (Na-fosfat, pH 6.5-8.0 Glisin-NaOH, pH 8.5-10.0 ve Boraks-NaOH, pH 10.5-12.5) kullanılarak en iyi aktivitenin görüldüğü pH değerinin ve aralığının saptanması için analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.22’de gösterilmiştir.

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 10.5 olduğu saptanmıştır. Optimum aktivitenin görüldüğü pH:10.5 değerinden sonra aktivitede hızla düşüş görülmüştür. Tüm pH değerleri dikkate alındığı zaman enzimin ortalama aktivitesinin %68,25 olduğu tespit edilmiştir.

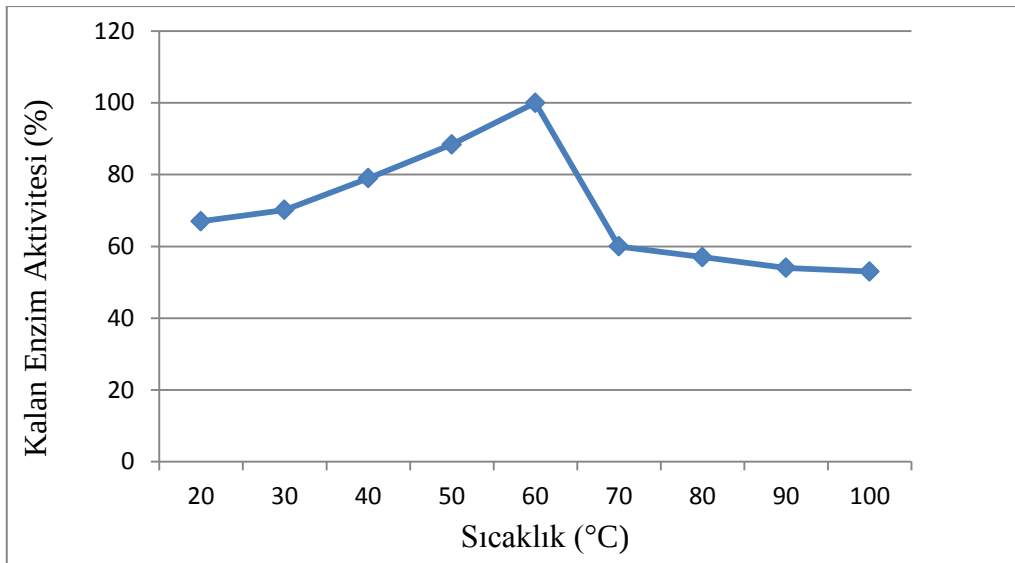


Şekil 4.22. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerine Ait Sonuçlar

4.9.1. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerine Ait Sonuçlar

Enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması için 20-100°C aralığındaki sıcaklıklarda optimum pH değerinde hazırlanmış substrat kullanılarak aktivite analizleri yapılmıştır (Şekil 4.23).

Analiz sonuçlarında selüloz enziminin optimum aktiviteyi gösterdiği sıcaklık 60°C olarak saptanmıştır. Tüm sıcaklık değerleri incelendiğinde enzim ortalama %69,84 aktivite göstermiştir.



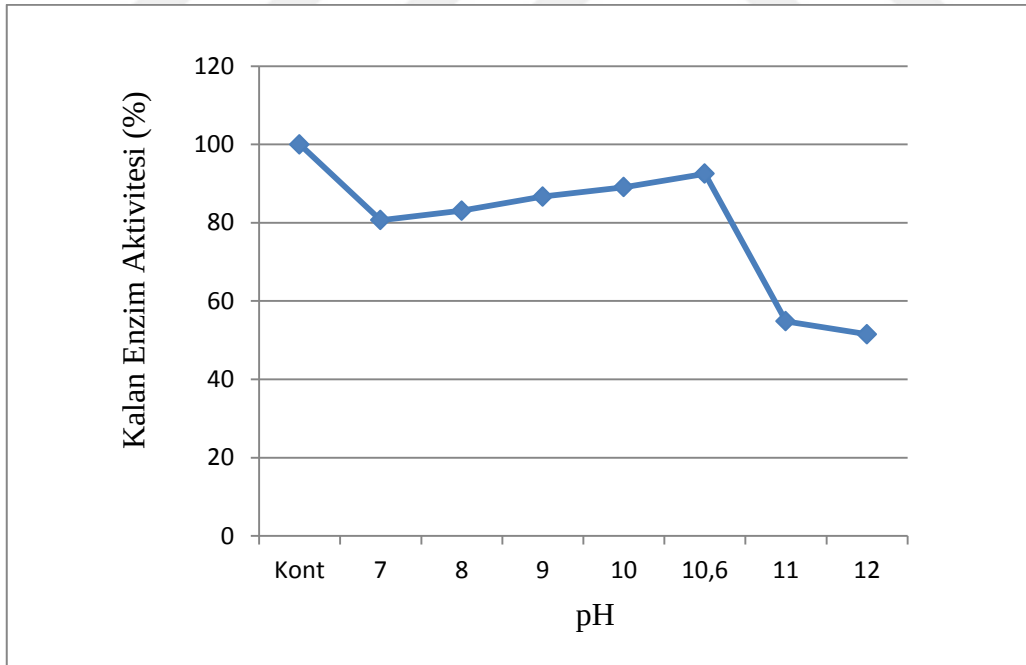
Şekil 4.23. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin Optimum Aktivite Sıcaklık Verileri

4.9.2. 12 Numaralı Suşun Selülaz Enziminin pH Stabilitesine Ait Sonuçları

12 numaralı suştan saflaştırılan enzimin pH stabilitesinin saptanması için pH 7.0-12.0 aralığında 24 saat 60°C de ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda optimum pH değerinde hazırlanmış substrat kullanılarak optimum aktivite sıcaklığında kalan aktivitenin saptanması için uygun süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.24).

Analiz sonucunda tüm pH değerleri incelendiğinde enzimin yaklaşık %77,93 oranında orijinal aktivitesini koruyarak stabil kaldığı görülmüştür. Enzimin; pH:7.0-10.5 aralığında ortalama %86,38 oranında orijinal aktivitesini koruduğu, bu değer üzerinde pH:11.0 ve pH:12.0 aralığında ise aktivitenin %52,79'a düştüğü gözlenmiştir.

Enzim, optimum aktivite gösterdiği pH değeri ve en yüksek aktivitenin elde edildiği pH aralıkları dikkate alındığında, pH stabilitesi sonucunda kalan aktivite değerlerinin bu sonuçlarla paralellik gösterdiği görülmüştür. Yani enzim, en yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değerinde en iyi stabiliteyi göstermiştir.

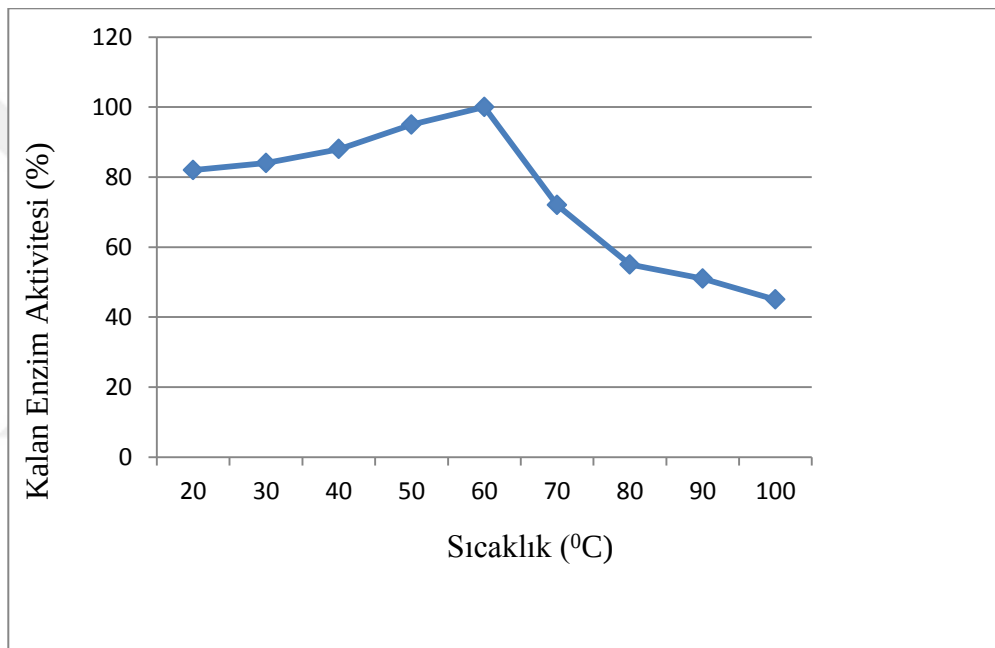


Şekil 4.24. 12 Numaralı Suşun Selülaz Enziminin pH Stabilite Verileri

4.9.3. 12 Numaralı Suşun Selüloz Enziminin Termal Stabilitesine Ait Sonuçları

12 numaralı selüloz enziminin termal stabilitesini saptamak amacıyla 20-100°C aralığında 30 dakika ön inkübasyon uygulanmıştır (Şekil 4.25).

Enzim ön inkübasyon gerçekleştirilen bütün sıcaklıklarda yaklaşık %74,66 oranında orijinal aktivitesini koruyarak stabil kalmıştır. Enzim; 20-70°C çalışma aralığında %86,83 oranında stabilitesini korurken; 80-100°C aralığında enzim aktivitesi %50,33'e düşmüştür.

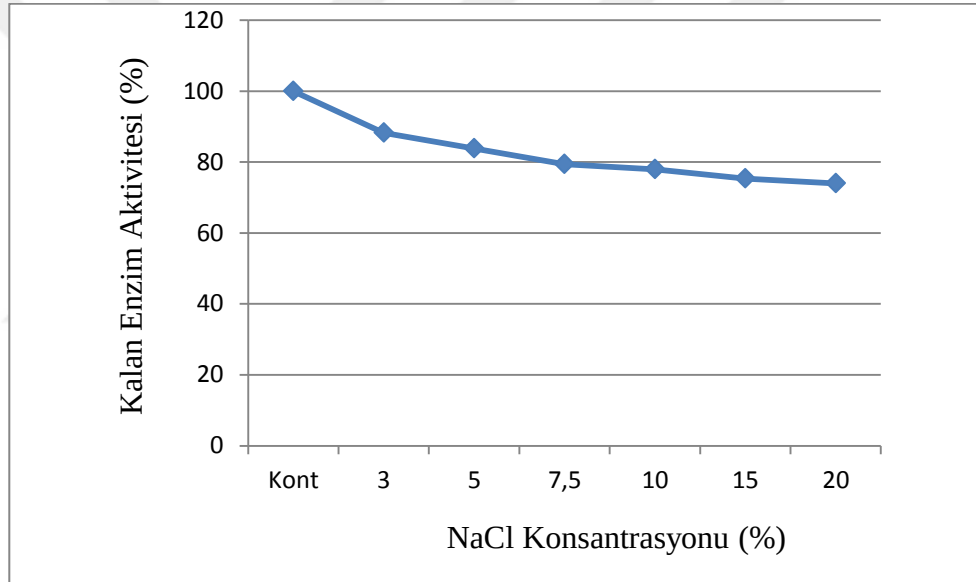


Şekil 4.25. 12 Numaralı Selüloz Enziminin Termal Stabilite Verileri

4.9.4. 12 Numaralı Suşun Selülaz Enzim Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisi

İzole edilen selülaz enzim aktivitesine NaCl'nin etkisini saptamak amacı ile içerisinde %3-20 NaCl bulunan optimum pH değerine sahip substratlar kullanılarak optimum aktivite sıcaklığında standart enzim aktivitesi analizleri yapılmıştır (Şekil 4.26).

Enzim aktivitesine farklı tuz konsantrasyonlarının etkisinin araştırılması amacıyla %3; %5; %7.5; %10; %15 ve %20 NaCl kullanılarak gerçekleştirilen 60 dakikalık ön inkübasyon işlemleri sonunda enzim önemli düzeyde stabilite göstermiştir. Enzim 60 dakika süreyle muamele edildiği zaman orijinal aktivitesini ortalama %79,79 oranında koruduğu saptanmıştır.

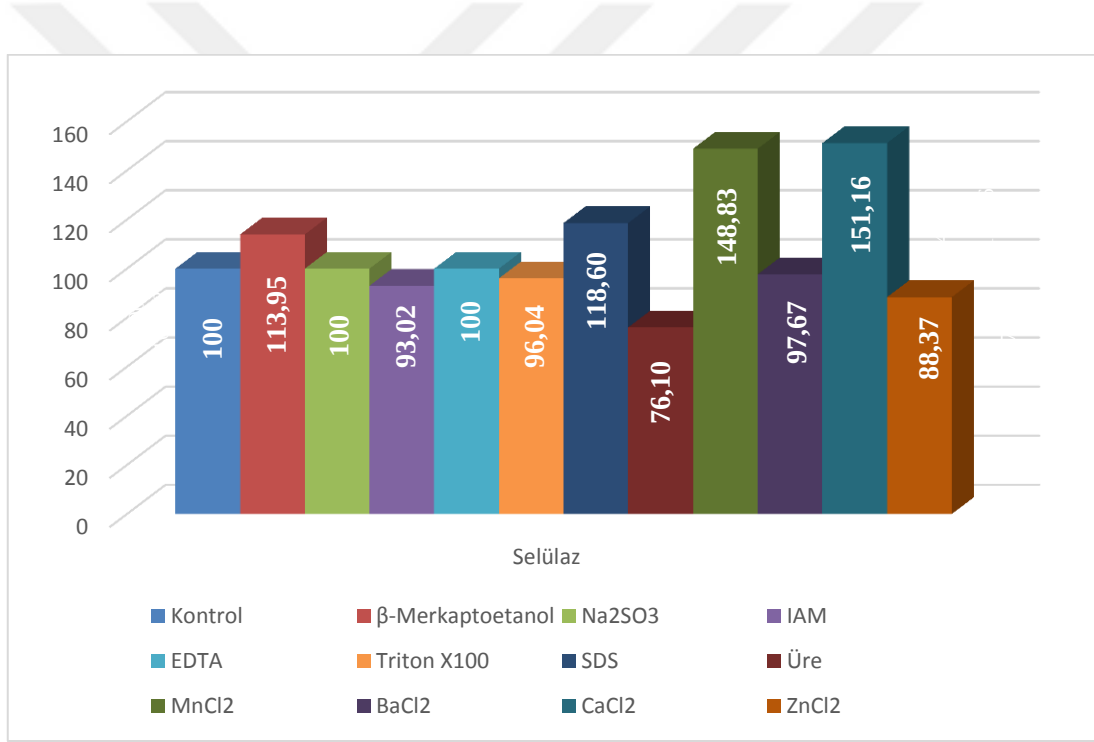


Şekil 4.26. 12 Numaralı Enzim Aktivitesine Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Etkisi

4.9.5. 12 Numaralı Suşun Selülaz Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Oksidanların Etkisi

İzole edilen selülaz enzimi farklı konsantrasyonlarda farklı inhibitör, metal iyonu, şelatör, deterjan ve oksidanlarla 60°C’de 60 dakika inkübe edildikten sonra standart aktivite analizi yapılarak kalan enzim aktivitesi saptanmıştır (Şekil 4.27).

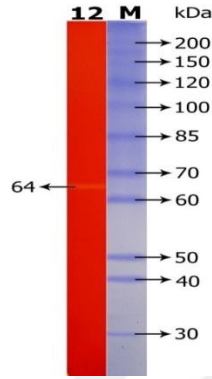
Kontrole göre %1 β -merkapttoetanol’ün %13,95; 5 %1 SDS’in %18,60; 5 mM MnCl_2 ’nin %48,83; 5 mM CaCl_2 ile %51,16 oranında enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Diğer yandan 5 mM IAM’nin %6,98; %1 Triton X-100’ün %3,96; 5 M Üre’nin %23,9; 5 mM BaCl_2 ’nin %2,33 ve 5 mM ZnCl_2 ’nin %11,63 oranında enzimi inhibe ettiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.27. 12 Numaralı Selülaz Enzim Aktivitesine İnhibör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Oksidanların Etkisi

4.9.6. 12 Numaralı Suşun Selülaz Enziminin SDS-PAGE ve Zimogram Analizi

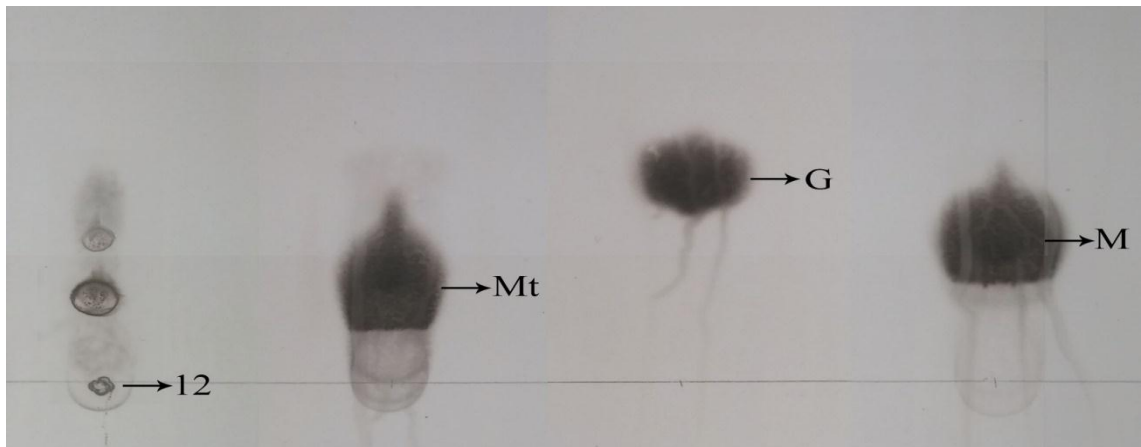
Selülaz enzimi %12'lik SDS-PAGE (%1 CMC içeren) sisteminde analiz edilerek enzime ait aktivite bölgeleri saptanmıştır. Zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlığı 64 kDa olan tek bir aktivite bandı saptanmıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. *Bacillus* sp. 12 Numaralı Suşun Selülaz Enziminin Moleküler Ağırlığı ve Zimogram Analizi (M:Marker)

4.9.7. 12 Numaralı Suşun Selülaz Enzimine Ait İnce Tabaka Kromatografisi Bulguları

12 numaralı selülaz enziminin ince tabaka kromatografisi analizlerine ait sonuçlar şekil 4.29'da verilmiştir. Analiz sonucunda 12 numaralı selülaz enziminin CMC'yi maltoz ve maltotrioza kadar parçaladığı fakat glikoza dönüştüremediği görülmüştür.

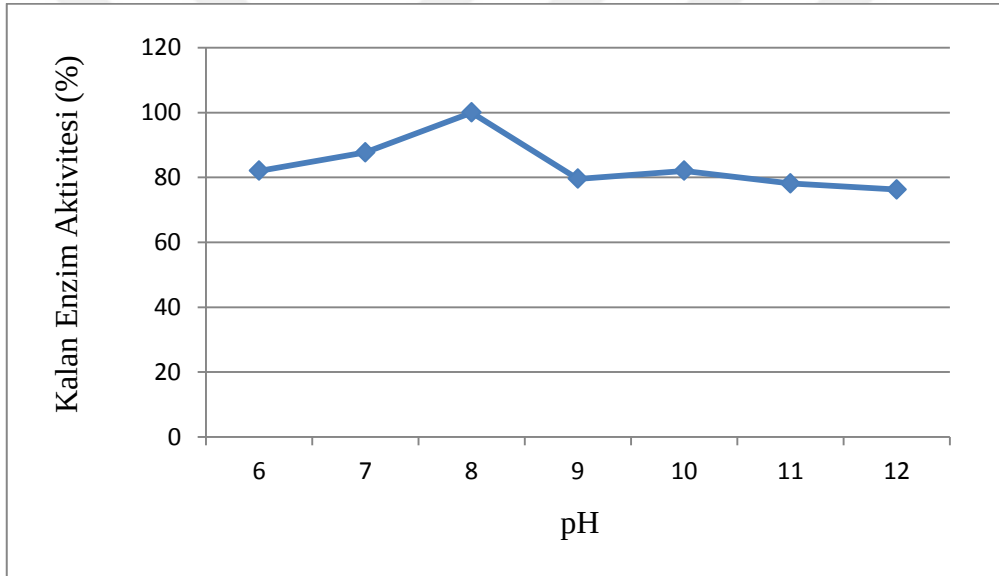


Şekil 4.29. *Bacillus* sp. 12 Numaralı Suşun Selülaz Enziminin İnce Tabaka Kromatografisi İle Son Ürünlerinin Belirlenmesi (G: Glikoz, Mt: Maltotrioz, M: Maltoz, 12: Selülaz Enzimi Hidroliz Ürünleri)

4.10. 9 Numaralı *Bacillus* sp. Suşunun Proteaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerine Ait Sonuçlar

9 numaralı suşun enzimi üç farklı tampon sistemi (Na-fosfat, pH 6.5-8.0 Glisin-NaOH, pH 8.5-10.0 ve Boraks-NaOH, pH 10.5-12.5) kullanılarak en iyi aktivitenin görüldüğü pH değerinin ve aralığının saptanması için analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.30'de gösterilmiştir.

İzole edilen proteaz enziminin pH:6.0-12.0 aralığındaki bütün pH değerlerinde yüksek düzeyde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin pH:8.0 olduğu saptanmıştır. Tüm pH değerleri dikkate alındığı zaman enzimin ortalama aktivitesinin %84,30 olduğu tespit edilmiştir.

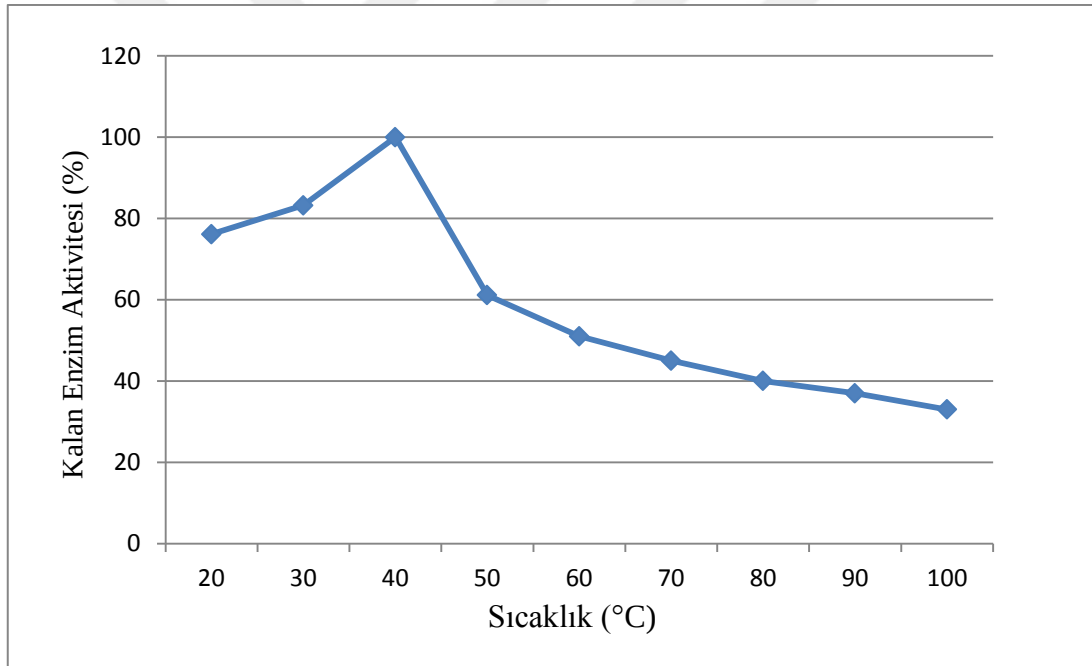


Şekil 4.30. 9 Numaralı Suşun Proteaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerine Ait Sonuçlar

4.10.1. 9 Numaralı Suşun Proteaz Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerine Ait Sonuçlar

Enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması için 20-100°C aralığındaki sıcaklıklarda optimum pH değerinde hazırlanmış substrat kullanılarak aktivite analizleri yapılmıştır (Şekil 4.31).

Analiz sonuçlarında proteaz enziminin optimum aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değeri 40°C olarak saptanmıştır. Tüm sıcaklık değerleri incelendiğinde enzim ortalama %58,57 aktivite göstermiştir. Optimum aktivitenin görüldüğü sıcaklık değerinin üzerine çıkıldığında aktivite hızla düşmüştür. Enzimin 20-50°C aralığında aktivitesinin %80,12 olduğu, yüksek sıcaklıklara çıkıldığında (60-100°C) aktivitenin ortalama %43,25'e indiği görülmüştür.

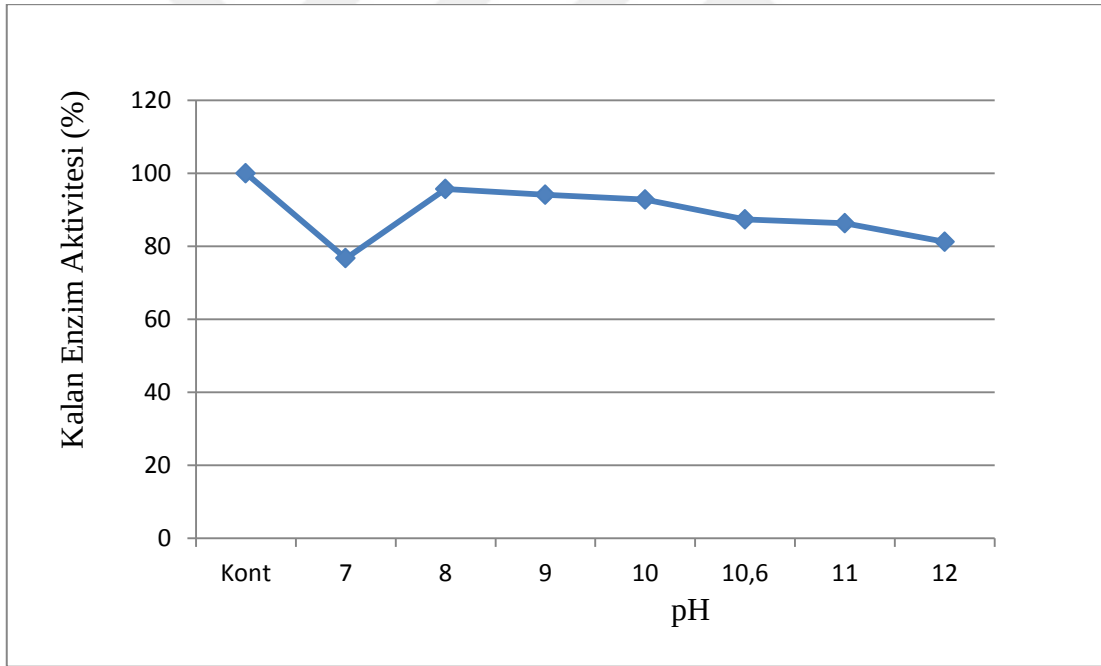


Şekil 4.31. 9 Numaralı Proteaz Enziminin Optimum Sıcaklık Değerine Ait Sonuçlar

4.10.2. 9 Numaralı Proteaz Enziminin pH Stabilitesine Ait Bulgular

9 numaralı proteaz enziminin pH stabilitesinin saptanması için pH 7.0-12.0 aralığında 24 saat 60°C de ön inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda optimum pH değerinde hazırlanmış substrat kullanılarak optimum aktivite sıcaklığında kalan aktivitenin saptanması için uygun süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.32).

Analiz sonucunda tüm pH değerleri incelendiğinde enzimin yaklaşık %87,73 oranında orijinal aktivitesini koruyarak stabil kaldığı görülmüştür. Enzim, optimum aktivite gösterdiği pH değeri (pH:8.0) ve en yüksek aktivitenin elde edildiği pH aralıkları dikkate alındığında, pH stabilitesi sonucunda kalan aktivite değerlerinin bu sonuçlarla paralellik gösterdiği görülmüştür. Yani enzim, en yüksek aktivitenin gözlemlendiği pH değerinde en iyi stabiliteyi (%95,68) göstermiştir.

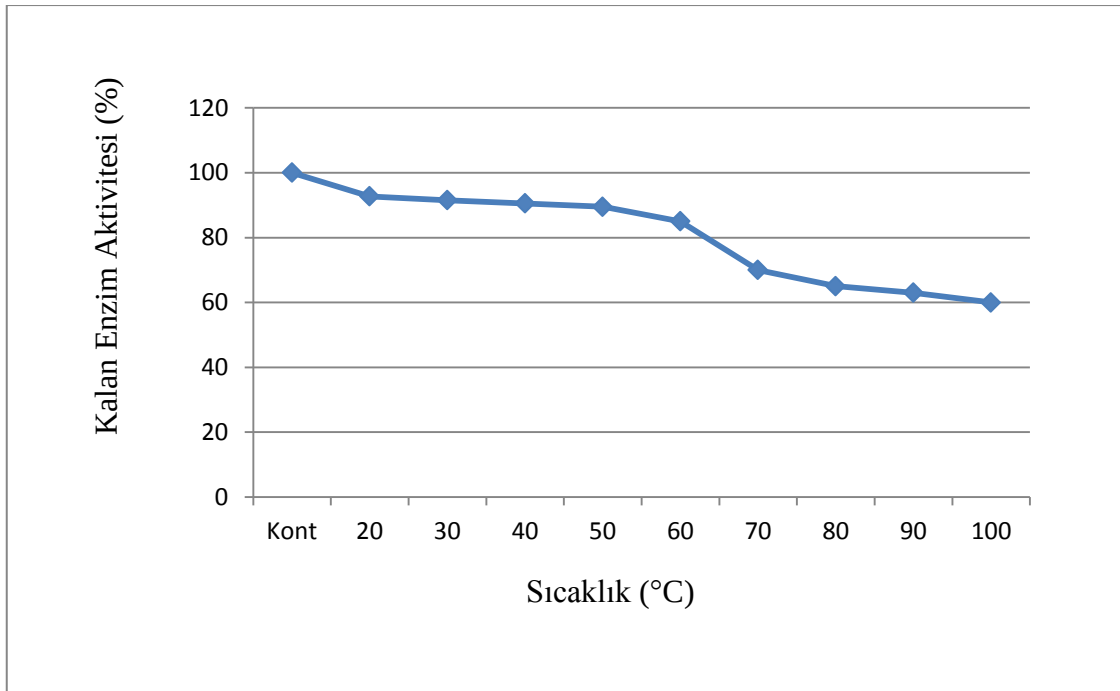


Şekil 4.32. 9 Numaralı Proteaz Enziminin pH Stabilite Değerleri

4.10.3. 9 Numaralı Proteaz Enziminin Termal Stabilitesine Ait Bulgular

İzole edilen proteaz enziminin termal stabilitesini belirlemek amacıyla 20-100°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde 30 dakikalık ön inkübasyon gerçekleştirilmiş ve standart aktivite analizi yapılmıştır (Şekil 4.33).

Analiz sonucunda tüm sıcaklık değerleri incelendiğinde ortalama %78,58 stabil kalmıştır. Enzimin stabilitesi 20-60°C aralığında %89,86 oranında korunmuştur. Daha yüksek sıcaklıklarda stabilitenin düştüğü görülmüştür (70-100°C aralığında %64,5).

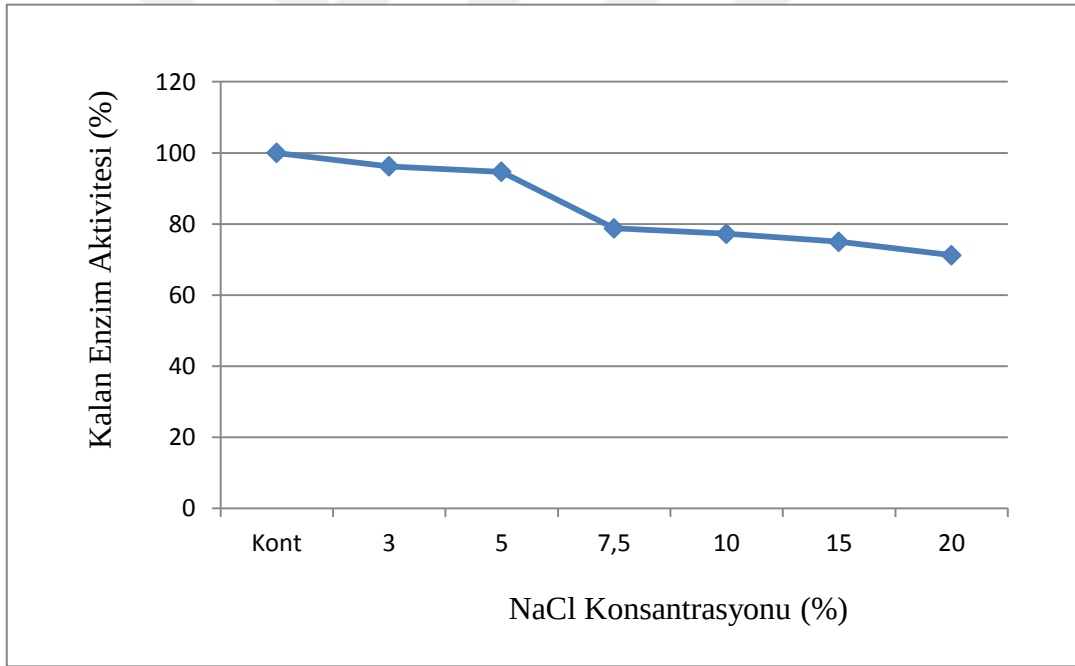


Şekil 4.33. 9 Numaralı Proteaz Enziminin Termal Stabilitesine Ait Bulgular

4.10.4. 9 Numaralı Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine NaCl'nin Etkisi

İzole edilen proteaz enzim aktivitesine NaCl'nin etkisini saptamak amacı ile içerisinde %3-20 NaCl bulunan optimum pH değerine sahip substratlar kullanılarak optimum aktivite sıcaklığında standart enzim aktivitesi analizleri yapılmıştır (Şekil 4.34).

Enzim aktivitesine farklı tuz konsantrasyonlarının etkisinin araştırılması amacıyla %3; %5; %7.5; %10; %15; %20 NaCl kullanılarak gerçekleştirilen 60 dakikalık ön inkübasyon işlemleri sonunda enzim önemli düzeyde stabilite göstermiştir. Enzim 60 dakika süreyle muamele edildiği zaman orijinal aktivitesini ortalama %82,19 oranında koruduğu saptanmıştır.

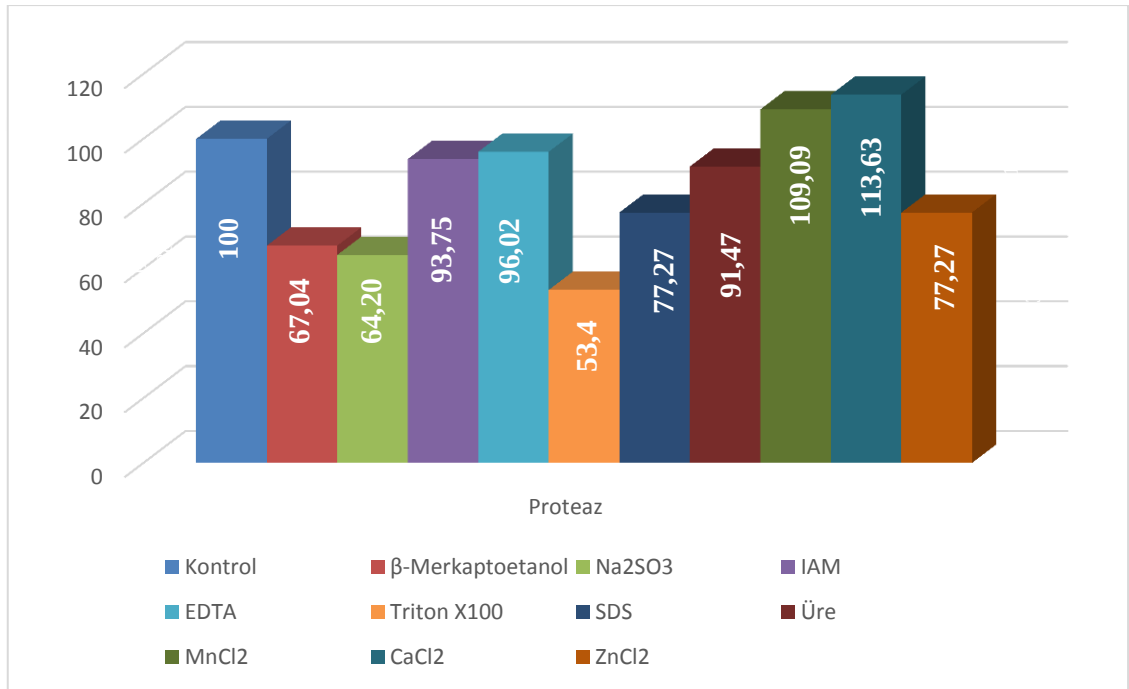


Şekil 4.34. 9 Numaralı Proteaz Aktivitesi Üzerine Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Etkisi

4.10.5. 9 Numaralı Proteaz Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Oksidanların Etkisi

İzole edilen proteaz enzimi farklı konsantrasyonlarda farklı inhibitör, metal iyonu, şelatör, deterjan ve oksidanlarla 40°C’de 60 dakika inkübe edildikten sonra standart aktivite analizi yapılarak kalan enzim aktivitesi saptanmıştır (Şekil 4.35).

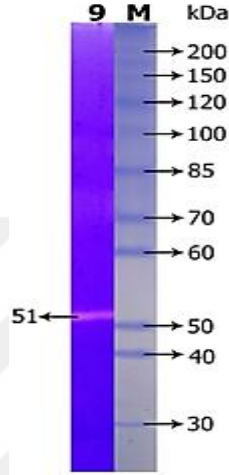
Kontrole 5 mM $MnCl_2$ ile %9,09; 5 mM $BaCl_2$ ile %11,93; 5 mM $CaCl_2$ ile %13,63 oranında enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür.



Şekil 4.35. 9 Numaralı Proteaz Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonu, Deterjan ve Oksidanların Etkisi

4.10.6. 9 Numaralı Proteaz Enziminin SDS-PAGE ve Zimogram Analiz Sonuçları

Proteaz enzimi %12'lik SDS-PAGE (%10 jelatin içeren) sisteminde analiz edilerek enzime ait aktivite bölgeleri saptanmıştır. Zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlığı 51 kDa olan tek bir aktivite bandı saptanmıştır (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. *Bacillus* sp. 9 Numaralı Suşun Proteaz Enziminin Moleküler Ağırlığı ve Zimogram Analizi (M:Marker)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Sinop ilinin çeşitli bölgelerinden toplanan toprak ve su örneklerinden *Bacillus* spp. izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. İdentifiye edilen isolatlar arasından, endüstriyel öneme sahip amilaz, selüloz ve proteaz enzim aktiviteleri bakımından etkin suşlar seçilmiş ve sonraki adımlarda en etkili izolattan kısmi saflaştırılan ilgili enzimlerin karakterizasyonu çalışılmıştır.

Çalışmada izolasyonu gerçekleştirilen 126 adet *Bacillus* spp.'nin tür düzeyinde tanımlanması amacıyla morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulanmıştır. Karakterize edilen bu suşların amilaz, selüloz ve proteaz enzim aktiviteleri belirlenmiş ve toprak örneklerinden elde edilen 80 *Bacillus* izolatının 40'ı, su örneklerinden elde edilen 46 *Bacillus* izolatının 14'ünde enzim aktivitelerinin bulunması nedeniyle çalışmaya bu 54 izolatla devam edilmiştir. Toplam 54 izolatın SDS-PAGE hücre-içi protein profilleri çıkartılarak kendi aralarında benzerlik oranları belirlenmiş ve ayrıca plazmide sahip olup olmadıkları incelenmiştir. Enzim aktiviteleri belirlenmiş olan suşların farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarında gelişimi ile enzim üretme yetenekleri araştırılmıştır. Enzim aktivitesi yönünden en iyi bulunan suşlar seçilerek amilaz, selüloz ve proteaz enzimleri izole edilmiş ve bu enzimlerin optimum pH aralığı, optimum sıcaklık aralığı, pH stabilitesi ve termal stabilitesi tespit edilmiştir. Enzim aktiviteleri üzerine farklı konsantrasyonlarda tuzluluğun, inhibitör, metal iyonu, şelatör, deterjan ve oksidanların etkisi araştırılarak enzimlerin SDS-PAGE ve zimogram analizleri sonucunda görünen aktif bandlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir. Ayrıca enzimlerin izole edildiği suşların 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi sonucu tanımlanması yapılmıştır.

54 adet *Bacillus* izolatının çeşitli biyokimyasal test sonuçlarına göre isolatların tümünün Gram pozitif, katalaz pozitif, çubuk şekilli, endospor oluşturabildikleri görülmüştür. Suşların 8'i (%14,81) %2 NaCl; 49'u (%90,74) %5 NaCl; 41'i (%75,92) %7 NaCl ve 27'si (%50) %10 NaCl içeren besi yerinde gelişme göstermiştir. Suşların 38'i (%70,37) pH:5; 54'ü (%100) pH:6 ve pH:7; 51'i (%94,44) pH:8; 48'i (%88,88) pH:9 ve 45'i (%83,33) pH:10'da gelişme göstermiştir. Bazı suşların nitratı nitrite indirgeme yeteneğinin olduğu ve jelatini parçalayabildiği görülmüştür. Suşların 24'ü (%44,44) 4°C'de; 54'ü (%100) 25°C ve 35°C'de; 47'si (%87,03) 45 °C'de; 15'i (%27,77) 55°C'de; 7'si (%12,96) 65°C'de gelişme göstermiştir. Yapılan karbonhidrat testlerine göre toprak kökenli suşlarda gaz oluşumu gözlenmediği ve laktozu

kullanamadığı, glikoz, maltoz, selüloz, fruktoz, trehaloz, galaktoz, mannoz ve arabinozu bazı suşların kullandığı tespit edilmiştir. Su kökenli suşların ise uygulanan karbonhidratların çoğunluğunu kullandığı bir kısmını kullanamadığı görülmüştür.

Valero ve ark. (2002), taze sebze ve soğutulmuş gıdalardan izole ettikleri *Bacillus cereus*'un karakterizasyonunda biyokimyasal ve fizyolojik testlerden faydalanmışlardır. Gajbhiye ve ark. (2010), topraktan izole ettikleri *Bacillus* suşlarının karakterizasyonunun belirlenmesinde gram boyama, anaerobik koşullar altında gelişim, hareketlilik, katalaz testi, nitratın nitrite indirgenmesi gibi biyokimyasal testleri uygulamışlardır. Erem ve ark. (2009), sünmüş ekmekten izole edilen *Bacillus* türlerinin klasik yöntemler ile tanımlanmasında Gram boyama, katalaz testi, Voges-Proskauer testi, karbonhidrat fermentasyon testleri, jelatin hidrolizasyon testi, sıcaklık ve tuzluluk tolerans testlerini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmamızda izole edilen *Bacillus* türlerinin identifikasyonunda kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler literatürdeki çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Bakteriyel türler arasındaki taksonomik ilişkilerin belirlenmesi ve bakteri tanımlanmasının hızlı bir şekilde yapılması SDS-PAGE'in kullanımının önemli olduğunu kanıtlamıştır (Berber, 2004). Çalışmada izole edilen 40'ı toprak, 14'ü su kökenli olmak üzere toplamda 54 *Bacillus* suşlarının SDS-PAGE toplam hücre içi protein profil sonuçları esas alınarak yapılan nümerik sınıflandırmada suşlar arasındaki benzerlik düzeyinin %63 ve üzerinde olduğu ve iki major gruba (A ve B) ayrıldığı görülmüştür. Berber ve Yenidünya (2005), Van Gölü ve çevresinden izole ettikleri *Bacillus* türlerini SDS-PAGE yöntemine göre karakterize etmişlerdir. Yerel izolatlar ve *B. megaterium*'u içeren benzerlik seviyesi %69 ve üzerinde değişen dört grup ve benzerlik seviyesi %70'in üzerinde diğer referans *Bacillus* türlerini içeren bir grup olmak üzere beş ayrı grup oluştuğunu bildirmişlerdir. SDS-PAGE yöntemi kullanılarak elde edilen hücresel protein profillerinin bilgisayar ortamında birleştirilmesinin *Bacillus* türlerinin taksonomik ilişkilerinin incelenmesinde önemli bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Berber ve ark. (2015), Sinop toprak örneklerinden izole ettikleri *Bacillus* suşlarının SDS-PAGE toplam hücre protein profillerine göre %78 üzerinde benzerlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yapılan bu çalışmaların verilerimizle paralellik gösterdiğini ifade edebiliriz.

Plazmid DNA; mikroorganizmaların ekstrakromozomal materyali olup, hücre sitoplazmasında serbest olarak bulunabilecekleri gibi mikroorganizmanın kromozomu ile entegre şekilde de bulunabilmektedir. Plazmid DNA'ların antibiyotiklere, metallere

ve ilaçlara karşı direnç kazandırdıkları aynı zamanda toksin formasyonları, pilus oluşumu, virülans faktörleri gibi bazı özellikleri taşıdıkları için de bakterilere avantaj sağladıkları bilinmektedir. (Kaynar ve Beyatlı, 2006). Alan (2015), doğal turşulardan izole ettiği *Lactobacillus paraplantarum* ve *Lactobacillus pentosus* suşlarının ortalama 1 plazmid içerdiğini ve izolatların en fazla 3 adet farklı plazmid bulundurduğunu ayrıca antibiyotik dirençlilikleri ile plazmid içeriği arasında doğrusal bir ilişkinin varlığını tespit edemediğini belirtmiştir. Bizim çalışmamızda ise izole edilen 54 adet *Bacillus* suşlarının büyüklüğü 20,678 ile 2,156 bç arasında değişen 5 farklı plazmid içerdiğini, enzim aktiviteleri de araştırılan izolatların plazmid içeriği ile doğrusal bir ilişkinin mevcut olmadığını söyleyebiliriz.

Bacillus cinsine ait türlerin çoğu güvenilir mikroorganizmalar olup tarım ve endüstriyel amaçlarda kullanılmakta olan birçok maddenin sentezlenmesinde etkin rol oynamaktadır. Gıdalarda patojen veya bozulma etkeni mikroorganizmaların büyümesini önleyebilen veya öldüren farklı çeşitlerde bakteriosin üretmektedirler (Topçal ve ark., 2014). Dünyada giderek ciddi bir sorun haline gelen tarımsal üretimin potansiyelini azaltan toprak tuzluluğunu ortadan kaldırmak veya şiddetli olumsuz etkilerini hafifletmek amacıyla yararlı toprak bakterisi olarak bilinen *Bacillus* izolatlarından faydalanılmaktadır (Han ve ark., 2014). Ayrıca bu cinsin bireylerinin çoğu zararsız, izolasyonu ve teşhisi kolay, genel olarak güvenilir, sentezledikleri proteinleri dış ortama salgılama kapasiteleri gibi birçok sebepten dolayı cazip endüstriyel organizmalardır. Bu durum *Bacillus* türlerinin endüstriyel enzim üretiminde öncelikli olarak tercih edilmesini sağlamıştır (Aygan, 2008). Çalışmada; toplam 54 suştan; 21 tanesi (%38,88) amilaz, 41 tanesi (%75,92) selüloz ve 6 tanesi (%11,11) proteaz enzim aktivitesi göstermiştir. Amilaz aktivitesi gösteren 21 suşun 17 tanesinin (%80,95) toprak, 4 tanesinin (%19,04) su kökenli, selüloz aktivitesi gösteren 41 suşun 34 'ünün (%82,92) toprak, 7'sinin (%17,01) su kökenli, proteaz aktivitesi gösteren 6 suşun 3'ünün (%50) toprak, 3'ünün (%50) su kökenli olduğu tespit edilmiştir. Suşların farklı pH ve sıcaklık değerlerinde üreme ve enzim üretme yetenekleri araştırılmış ve amilaz enzimi için 4, selüloz enzimi için 12 ve proteaz enzimi için 9 numaralı suşlar seçilmiştir.

16S rRNA sekans analizleri sonucunda; yüksek enzim aktivitesi gösteren 4, 9 ve 12 numaralı suşların *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Suşlardan 4 numara suşun *B. subtilis* strain CICC10048, 9 ve 12 numaralı suşların ise *B. thuringiensis* strain m-4 suşlarıyla yakın ilişkili olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızla benzer şekilde Ali ve ark. (2016), tuz madenlerinden izole ettikleri 54 bakteri suşundan proteaz aktivitesi

yüksek olan BLK-1.5 suşunun 16S rRNA sekans analizi sonucu *Bacillus* cinsine ait *B. subtilis* subsp. *Spizizenii* NRRLB-23049 suşuyla yakın ilişkili olduğunu bildirmiştir. Vahabi ve ark. (2015), ise topraktan izole ettikleri kalsiyum karbonat presipitasyonu bakımından etkin olan AK01 suşunun karakterizasyonunu belirlemek amacıyla morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin ardından gerçekleştirdiği 16S rRNA sekans analizi sonucunda suşun *Bacillus* genusuna ait *B. licheniformis* B2S1 suşuna benzer olduğunu rapor etmişlerdir

Bu çalışmada amilaz, selüloz ve proteaz enzim üretiminde en yüksek aktiviteyi gösteren suşların *B. subtilis* ve *B. thuringiensis* suşları olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde daha önce gerçekleştirilen enzim çalışmalarında enzim üreticisi olarak bu suşlardan yararlanılmıştır (Blanco ve ark., 2016; Lassoued ve ark., 2015; Chen ve ark., 2015; Emtenani ve ark., 2015; Smitha ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2015).

Yaptığımız çalışmada 4 numaralı suştan, amilaz enzimi 45°C'de pH:9.0'da %3 NaCl içeren ortamda üretilmiştir. Annamalai ve ark. (2011a), yaptıkları çalışmada *Bacillus cereus* suşunun enzim sentezini optimum pH:7.0'de 35°C'de gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda 4 numaralı amilaz enzimi optimum aktivitesini pH:8.0'de gerçekleştirmiştir. Ayrıca enzim analiz edilen tüm pH değerlerinde ortalama %70,86 aktivite göstermiştir. Liu ve Xu (2008), *Bacillus* sp. YX-1 suşundan izole ettikleri amilaz enziminin optimum aktivitesini pH:5.0'de; pH:4.5-11.0 aralığında ise enzimin %80 oranında aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Asoodeh ve ark. (2010), *Bacillus* sp. *ferdowsicus* suşundan izole ettikleri amilaz enziminin optimum aktivitesinin pH:4.5 olduğunu ancak pH:3.5-7.0 aralığında ise %75 oranında aktivitesini koruduğunu rapor etmişlerdir. Annamalia ve ark. (2011a), *Bacillus cereus* suşundan izole ettikleri amilaz enziminin optimum aktivitesini pH:8.0 ve 65°C'de gösterdiğini belirtmişlerdir. Punia ve ark. (2016), *Bacillus subtilis* suşundan izole ettikleri amilaz enziminin pH:4.0-10.0 aralığında aktivite gösterdiğini optimum aktivitesini ise pH:8.0'de gerçekleştirdiğini ve pH değeri aşıldıkça aktivitede düşüşler gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda 4 numaralı amilaz enziminin optimum sıcaklığı 40°C olarak saptanmıştır. Ayrıca enzim; 20-50°C aralığında ortalama %79,21 oranında aktivitesini korumuştur. Liu ve Xu (2008), optimum sıcaklık aralığının 40-50°C olduğunu, sıcaklığın 60°C üzerine çıkmasıyla aktivitenin hızla düştüğünü belirtmişlerdir. Asoodeh ve ark. (2010), enzimin 30-75°C aralığında aktif olduğunu, optimum sıcaklık değerinin ise 70°C olduğunu bildirmişlerdir. Annamalia ve ark. (2011), yüksek sıcaklıklara çıkıldığında enzim aktivitesinde düşüşler yaşandığını

90°C'nin üzerinde ise enzim aktivitesini tamamen kaybettiğini rapor etmişlerdir. Punia ve ark. (2016), optimum sıcaklığını ise 37°C'de gözlemlediklerini ve sıcaklık arttırıldığında enzim aktivitesinin düştüğünü belirterek bunun nedeninin mikroorganizmanın gelişimini etkileyen yüksek sıcaklığın enzimin yapısını bozmasıyla ilişkilendirmiştir. Çalışmamızda 4 numaralı amilaz enziminin 40°C'de 42 saat ön inkübasyona tabi tutulması sonucunda enzim %82,92 oranında stabil kalarak geniş pH aralığında yüksek düzeyde stabilite göstermiştir. Enzimin tüm sıcaklık değerlerinde 30 dakikalık ön inkübasyon uygulamasından sonra (20-100°C) yaklaşık %78,44 oranında orijinal aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir. Enzim 20-70°C aralığında %94,66 oranında yüksek stabilite göstermesine rağmen 80-100°C aralığında enzimin stabilitesi %46'ya düşmüştür. Liu ve ark. (2008), 60°C'de 1 sa inkübasyonu takiben enzimin orijinal aktivitesinin %60 oranında korunduğunu bildirmişlerdir. Asoodeh ve ark. (2010), ise enzimin 70°C'de 1 saat inkübe edilmesiyle aktivitesinin %100 oranında korunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda 4 numaralı amilaz enzimi %3-20 NaCl konsantrasyonlarında 40°C'de 1 saat inkübasyona tabi tutularak aktivite sonuçları incelenmiş ve enzimin tüm konsantrasyonlarda ortalama %62,86 oranında stabilitesini koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca amilaz enzimi %1 β -merkaptotanol'e, 5 mM Na_2SO_3 'e, 5 mM EDTA'ya, %1 Triton X-100'e, %1 SDS'e 5 mM Üre'e, 5 mM BaCl_2 'e, 5 mM ZnCl_2 'e sırasıyla %92,15; %88,62; %81,2; %75,6; %72,32; %45,1; %67,02; %64,89 oranında direnç göstermiştir. Öte yandan enzimin 5mM IAM, 5 mM MnCl_2 ve 5 mM CaCl_2 varlığında sırasıyla %6,38; %1,06 ise %38,29 oranında aktivitesini arttırdığı saptanmıştır. Asoodeh ve ark. (2010), enzimin metal iyonlarına ve inhibitörlerine karşı etkisini incelemişler ve sonuçları; 5mM ZnCl_2 , 5 mM EDTA ve 5 mM CaCl_2 'nin sırasıyla %60, %85 ve %92 oranında enzimin aktivitesini düşürdüğünü, 5 mM BaCl_2 'nin ise %15 oranında arttırdığını, oysaki β -merkaptotanol'ün enzimin stabilitesini etkilemediğini bildirmişlerdir. Annamalia ve ark. (2011a), enzimi 1 mM CaCl_2 ve MgCl_2 ile muamele ettiklerinde sırasıyla %90 ve %89 oranında enzimin orijinal aktivitesini koruduğunu, 1 mM EDTA ile muamele edildiğinde ise enzimin tamamen inhibe olduğunu, 1 mM MnCl_2 ile enzim aktivitesinin %4 oranında arttığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda 4 numaralı enzimi %12'lik SDS-PAGE sistemiyle analiz edilerek aktivite bölgeleri saptanmıştır. Zimogram analizi sonucunda 4 numaralı enzimin moleküler ağırlığı 120 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin molekül ağırlığının Liu ve ark. (2008), 56 kDa, Asoodeh ve ark. (2010), 53 kDa, Annamalia ve ark. (2011), 42 kDa, Punia ve ark. (2016), 48 kDa, Ray ve ark (2008) 205 kDa, Shafiei ve ark

(2010), 100 kDa olarak belirlenmiştir. Son olarak 4 numaralı enzimin optimum aktivite sıcaklığı ve pH değerinde nişastayı parçalaması sonucunda ince tabaka kromatografisinde elde edilen hidroliz ürünlerinin maltoz ve maltotrioz olduğu saptanmıştır. Asodeh ve ark. (2010), enzimin nişastayı tamamen parçalamasıyla glukoz, maltoz ve maltotrioz gibi hidroliz ürünlerinin ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler literatürdeki araştırmalarla karşılaştırıldığında sonuçlar birbirleriyle yakın şekilde örtüşmektedir.

12 numaralı suştan selüloz enzimi; 55°C’de pH:8.0’de %10 NaCl içeren besi yerinde geliştirilmiştir. Das ve ark (2010), termofilik *Bacillus* sp. suşunun selüloz üretme yeteneğinin optimum pH 8.0’de ve 51°C’de; Annamalai ve ark. (2011b), *Bacillus* AU01 suşundan selüloz enzim üretiminin ise pH 9.0’da ve 50°C’de gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda 12 numaralı selüloz enzimi optimum aktivitesini pH:10.5’te gösterirken enzimin çalışma aralığı pH:8.5-10.5 olarak saptanmıştır. Optimum aktivitenin görüldüğü pH değerinin üzerine çıkıldıkça selüloz enzim aktivitesi de düşmüştür. Trivedi ve ark. (2011), yapmış oldukları çalışmada, *Bacillus aquimaris* suşundan izole ettiği selüloz enziminin pH:11.0’de optimum olduğunu, pH:9.0-11.0 aralığında ise enzimin aktivitesinin arttığını ancak pH:13.0’e çıkıldığında aktivitenin düştüğünü bildirmişlerdir. Çalışmamızda 12 numaralı selüloz enziminin optimum sıcaklığı 60°C olarak tespit edilmiştir. Sıcaklık arttıkça selüloz enziminin aktivitesinde düşüşler yaşanmıştır. Tüm sıcaklık değerleri dikkate alındığında ise ortalama %69,84 oranında enzimin aktivite gösterdiği saptanmıştır. Zhao ve ark. (2012), selüloz enziminin optimum aktivitesini 65°C olarak saptamışlardır ve enzimin 40-70°C aralığında %60’tan daha fazla aktiviteye sahip olduğu belirterek bu sıcaklık değerinin üzerine çıkıldığında enzim aktivitesinin düştüğünü bildirmişlerdir. Gaur ve Tiwari (2015), *B. vallismortis* RG07 suşundan elde ettikleri selüloz enziminin 65°C ve pH:7.0’de optimum olduğu enzimin aktivitesinin 95°C ve pH:9.0 da sırasıyla %95 ve %75 oranında koruduğunu, Manfredi ve ark. (2016), *Bacillus* sp. ARO3 suşundan izole ettikleri selüloz enziminin ise 60°C’de optimum aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Vijayaraghavan ve ark. (2016), *Bacillus halodurans* IND18 suşundan izole ettikleri selüloz enziminin optimum aktivitesinin ise pH:8.0’de 60°C’de gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda 12 numaralı enzimin tüm pH değerlerinde %77,93 oranında stabil kaldığı görülmüştür. Ayrıca enzim optimum olduğu pH değerinde en yüksek stabiliteyi göstermiştir. Lin ve ark. (2012), yapmış olduğu çalışmada selüloz enziminin farklı pH’larda 50°C’de 1 saat inkübe edilmesiyle enzimin pH:4.2-10.3 aralığında %70

ve üzerinde aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada 12 numaralı selüloz enziminin tüm sıcaklık değerlerinde (20-100°C) 30 dakikalık ön inkübasyondan sonra yaklaşık %74,11 oranında orijinal aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir. Sıcaklık değerleri incelendiğinde enzim 20-70°C aralığında %84,16; 80-100°C aralığında ise %54 stabil kalmıştır. Shanmughapriya ve ark. (2010), saflaştırdıkları selüloz enzimini 1 saat farklı sıcaklıklarda ön inkübasyona tabi tutarak standart aktivite tayinini saptamışlardır. Araştırmacılar enzimin 27 ve 30°C arasında oldukça stabil olduğunu ancak 40°C'den sonra ise enzimin hızla aktivitesini kaybettiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda 12 numaralı selüloz enzimi; farklı konsantrasyonlarda NaCl ile 60°C'de 1 saat muamele edildiğinde enzimin orijinal aktivitesinin %79,79'unu koruduğu gözlenmiştir. Li ve Yu (2012), *Bacillus* sp. L1 suşundan izole ettikleri selüloz enziminin %2.5-20 aralığındaki tuz konsantrasyonlarında ortalama %80 aktivitesini koruduğunu rapor etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada 12 numaralı selüloz enziminin 60°C'de bir saat süreyle %1 β -merkaptoetanol, %1 SDS, 5 mM $MnCl_2$, 5 mM $CaCl_2$ ile muamelesi sonucunda sırasıyla enzimin aktivitesinin %13,95; %18,60; %48,83 ve %51,16 oranında arttığı gözlenmiştir. Diğer yandan 5 mM IAM, %1 Triton X-100, 5 M Üre, 5 mM $BaCl_2$ ve 5 mM $ZnCl_2$ 'nin sırasıyla %6,98; %3,96; %23,9; %2,33 ve %11,63 oranında enzimi inhibe ettiği tespit edilmiştir. Huang ve Monk (2004), saflaştırdıkları selüloz enziminin, $ZnCl_2$, EDTA, β -merkaptoetanol, %1.25 SDS ve %1.25 Triton X-100 ile muamelesi sonucunda sırasıyla %12,7; %87,6; %9,9; %11,3; %8,5 ve %5,6 oranında enzimi inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Gaur ve Tiwari (2015), *B. vallismortis* RG07 suşundan elde ettikleri selüloz enziminin $CaCl_2$, betamerkaptoetanol ve tween-60'ın enzim aktivitesini arttırdığını Hg'nin ise enzimi inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda 12 numaralı selüloz enzimi SDS-PAGE ile analiz edilerek enzimin aktivite bölgeleri saptanmıştır. Zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlığı 64 kDa olan tek aktivite bandı bulunmuştur. Ayrıca enzimin optimum aktivite sıcaklığında ve pH değerinde nişastayı parçalaması sonucunda ince tabaka kromatografisinde elde edilen hidroliz ürünlerinin maltoz ve maltotrioz olduğu tespit edilmiştir. Literatürde selüloz enziminin moleküler ağırlığı 48 kDa (Sriariyanun ve ark., 2016); 80 kDa (Gaur ve Tiwari, 2015); 286, 208 ve 157 kDa (Manfredi ve ark., 2016) olarak belirtilmiştir. Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler literatürdeki diğer araştırmalarla paralellik göstermektedir.

9 numaralı suştan, proteaz enzimi pH:9.0'da 45°C'de üretilmiştir. Enzimin optimum aktivitesinin pH:8.0'de gerçekleştiği ve tüm pH değerleri incelendiğinde

enzimin ortalama aktivitesinin %84,30 oranında yüksek düzeyde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Wang ve ark. (2008), *Pseudoalteromonas* NJ276 suşundan ekstraselüler soğukta aktif proteaz izolasyonunu gerçekleştirmişler ve enzimin optimum pH 5.0-12.0 arasında aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Ali ve ark. (2015), *B. subtilis* BLK-1.5 suşundan izole ettikleri proteaz enzimini pH:10'da, 37°C'de ve %7 NaCl içeren ortamda üretmişlerdir ve enzimin optimum aktivitesini ise pH:10'da ve 50°C'de gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda 9 numaralı proteaz enziminin optimum sıcaklık değerinin 40°C olduğu ve 20-50°C'de enzimin aktivitesini %80,12 oranında koruduğu ve yüksek sıcaklıklarda ise aktivitenin düştüğü gözlenmiştir. Uyar ve ark. (2011), *Bacillus* sp. CA15 suşundan izole edilen proteaz enziminin pH ve sıcaklık aralığının pH:7.0-11.0 ve 30-60°C'de olduğunu belirtirken optimum sıcaklığının ise 35°C'de gözlendiğini bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada 9 numaralı proteaz enziminin pH ve termal stabilitesi incelendiğinde; enzim sırasıyla ortalama %87,73 ve %78,58 oranında orijinal aktivitesini korumuştur. Deng ve ark. (2010), *Bacillus* sp. B001 suşundan izole edilen proteaz enziminin termal ve pH stabilitesinin sırasıyla 20-90°C ve pH:5.0-12.0 aralığındaki değerler olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda 9 numaralı proteaz enziminin Enzim 60 dakika süreyle farklı NaCl konsantrasyonlarıyla muamele edildiğinde orijinal aktivitesini ortalama %82,19 oranında koruduğu saptanmıştır. Bhardwaj ve Satyanarayana (2005), *Bacillus* sp. MLB-2 suşundan izole edilen proteaz enziminin %3-10 aralığındaki tuz konsantrasyonlarında ortalama %78 oranında aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Çalışmamızda 9 numaralı proteaz enzimi üzerine inhibitör, şelatör, metal iyonu, deterjan ve oksidanların etkisi incelendiğinde, 5 mM MnCl₂ ile %9,09; 5 mM BaCl₂ ile %11,93; 5 mM CaCl₂ ile %13,63 oranında enzimin aktivitesinde artış görülmüştür. Diğer yandan %1 β-merkaptetanol'ün, 5 mM Na₂SO₃'ün, 5 mM IAM 'nin, 5 mM EDTA'nın, %1 Triton X-100'ün, %1 SDS'in, 5 M Üre ve 5 mM ZnCl₂'nin sırasıyla %32,96; %46,6; %6,25; %3,98; %46,6; %22,73; %8,53 ve %8,53 oranında enzim inhibisyonuna yol açtığı tespit edilmiştir. . Deng ve ark. (2010), *Bacillus* sp. BOO1 suşundan izole edilen proteaz enziminin 5mM EDTA ve β-merkaptetanol ile muamelesi sonucunda sırasıyla %80 ve %108 oranında; Olivera ve ark. (2006), *Bacillus patagoniensis* suşundan izole edilen proteaz enziminin %1 SDS ile muamelesiyle orijinal aktivitesini yaklaşık %73 oranında koruduğunu tespit etmişlerdir. 9 numaralı proteaz enzimi SDS-PAGE ile analiz edilerek enzime ait aktivite bölgeleri saptanarak zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlığı 51 kDa olan tek bir aktivite bandı elde edilmiştir. Literatürlerde proteaz enziminin moleküler ağırlıkları 66 kDa, 40

kDa, 26 kDa ve 62 kDa (Han ve ark., 2013); 38 kDa (Ali ve ark., 2015) olarak bildirilmiştir. Bulgularımız literatür verileriyle paralellik göstermektedir.

Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında 4, 9 ve 12 numaralı suşlardan izole edilen enzimlerin çeşitli deterjan, inhibitör, metal iyonu ve şelatörlere karşı dirençli olmaları bu enzimlerin meyve suyu tekstil, fırıncılık, biracılık gibi birçok endüstriyel alanlarda kullanılma potansiyeli bulabileceği söylenebilir. Literatürde enzimin üre ile inhibisyonunun; enzimin hidrofobik aminoasit içermesinden kaynaklı olabileceği, EDTA ile inhibe olmasının enzimin metalloenzim (metale bağımlı) yapısına kanıt gösterilebileceği bildirilmiştir. Diğer yandan Ca^{+} ve Mn^{+} gibi metal iyonlarıyla enzimlerin aktivitesinin artmasının iyonların kofaktör olarak işlev görmesinden, Zn^{+} gibi inhibe edici iyonların ise aktiviteyi düşürmesinin nedeninin iyonun enzimin aktif bölgesine bağlanmasından kaynaklandığını ifade etmişlerdir (Shafiei ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2010; Annamalai ve ark., 2010).

Enzim teknolojisinin gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin yüksek olması nedeniyle endüstriyel enzimlerle ilgili alanda yapılan araştırmalar gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Gözükara, 2009). Mikroorganizmaların biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik uygulamalara elverişli olması endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin büyük bir çoğunluğunun mikroorganizmalardan üretilmesine imkan sağlamıştır (Wolfgang, 2004; Turus, 2011). Bunun nedeninin mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ekonomik olmaları gibi avantajlar sunmasıdır. Sunulan bu avantajlar, endüstriyel önemlerinden dolayı uygun enzimleri üreten suşların özellikle *Bacillus* türlerinin izolasyonuna olan ilgiyi arttırmıştır. *Bacillus* türlerinin habitatlarının toprak olmasına rağmen doğada birçok ortamda bulunabilmesi; antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi özellikleri ve kolay üretilibilmeleri nedeniyle bakteriler arasında en önemli grubu temsil etmektedirler.

Sonuç olarak; endüstriyel öneminin ve kullanımının yaygın olması nedeniyle çalışmamızda Sinop ili toprak ve su örneklerinden *Bacillus* spp. suşlarının izolasyonu hedeflenmiş ve gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda kısmi olarak saflaştırılan enzimlerin çeşitli endüstriyel alanlarda kullanım olanağı bulabilmesi ve dış ülkelerden satın alınan bazı enzimlerin ülkemizde üretilmesi ve böylece ülke ekonomisine katkıda bulunulması mümkün olabilecektir. Enzim aktivitesi yüksek olarak seçilen mikroorganizmanın insan sağlığına etkilerinin araştırılması ile GRAS (Genel olarak güvenli kabul edilen - Generally Recognized as Safe) mikroorganizma olduğu

saptanırsa, elde edilen enzimlerin gıda sanayisinde kullanılması da önem kazanacaktır. Başlangıçta kaba enzim ekstraktlarına dayanan çalışmalar moleküler çalışmaların gelişmesiyle yerini gen düzeyinde ve hatta gen üzerindeki farklı bölgeleri ayrıntılı olarak inceleyen çalışmalara bırakmıştır. Bu çalışmayı takiben enzim üretim kapasiteleri açısından izole edilen en aktif suşların ekonomik öneme sahip enzimleri kodlayan genlerinin belirlenmesi ve bu genlerin farklı organizmalarda ekspresyonunun (ifadelenmesinin) gerçekleştirilmesi hedeflenerek seri şekilde üretilebilme stratejilerine odaklanması çalışmamızın gelecekteki perspektifi açısından önemlidir.



6. KAYNAKÇA

- Abell, G. C., McOrist, A. L. 2007. Assessment of the Diversity and Stability of Faecal Bacteria From Healthy Adults Using Molecular Methods. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 19(4), 229-240.
- Adınarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, S.D. 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease From A Newly Isolation *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech*, India, 4(4): 56.
- Aehle, W. 2004. Enzymes in industry production and application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Alan, D. 2015. Doğal Turşulardan *Lactobacillus Paraplantarum* ve *Lactobacillus Pentosus* Suşlarının Moleküler Tanımlanması ve Plazmid İçeriklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Ali, N., Ullah, N., Qasim, M., Rahman, H., Khan, S. N., Sadiq, A., Adnan, M. 2016. Molecular Characterization and Growth Optimization of Halo-tolerant Protease Producing *Bacillus subtilis* Strain BLK-1.5 Isolated From Salt Mines of Karak, Pakistan. *Extremophiles*, 1-8.
- Annamalai, N., Thavası, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. 2011a. Extraction, Purification and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant α -Amylase from *Bacillus cereus*. *Indian J Microbiol*, 51:424-429.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Elayaraja, S., Balasubramanian, T. 2013. Thermostable, Haloalkaline Cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by Conversion of Lignocellulosic Wastes. *Carbohydrate polymers*, 94(1), 409-415.
- Anonim, 2015a. <http://www.sinop.gov.tr/cografya> (Erişim tarihi: 23.10.2015).
- Anonim, 2015b. <http://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?m=SINOP> (Erişim tarihi: 23.10.2015).
- Arikan, 2008. Highly Thermostable, Thermophilic, Alkaline, SDS and Chelator Resistant Amylase from a Thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresource Technology*.
- Aslantas, Ö. Ö., Çelebi, F., Açık, A., Ergün, L. 2006. Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Subclinic Bovine Mastitis by

- Protein Patterns, Antibiotic Resistance and Plasmid Profile. Ankara Üniv. Vet. Derg, 53, 47-51.
- Aslim, B., Beyatli, Y. 2004. Antibiotic Resistance and Plasmid DNA Contents of *Streptococcus thermophilus* Strains Isolated From Turkish Yogurts. Turkish Journal of Veterinary And Animal Sciences, 28(2), 257-263.
- Asoodeh, A., Chamani, J., Lagzian, M. 2010. A Novel Thermostable, Acidophilic α -Amylase From A New Thermophilic “*Bacillus* sp. Ferdowsicus” Isolated From Ferdows Hot Mineral Spring In Iran: Purification And Biochemical Characterization. International Journal Of Biological Macromolecules, 46(3), 289-297.
- Aydın, 2004. Bakteri İdentifikasyonunda Kullanılan Standart, Biyokimyasal Ve Fizyolojik Testler. Güneş Yayınevi, Ankara, 91-110.
- Aygan, A. 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 186 s.
- Azizoğlu, U. 2014. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşuna Ait *cry1* ve *cry2* Genlerinin Klonlanması, İfadesi ve Böcek Öldürücü Etkilerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 147s.
- Azizoğlu, U. 2014. *Bacillus thuringiensis* SY49-1 Suşuna Ait *cry1* ve *cry2* Genlerinin Klonlanması, İfadesi ve Böcek Öldürücü Etkilerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 147 s.
- Batur, L.K., Aygan, A. 2015. Kahramanmaraş Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Tarafından Alfa-Amilaz Üretimi ve Karakterizasyonu. Karaelmas Science & Engineering Journal, 5(2).
- Berber, I. 2004. Characterization of *Bacillus* Species by Numerical Analysis of Their SDS-PAGE Protein Profiles. J. Cell Mol. Biol., 3: 33–37.
- Berber, I., Alan, N., Ekin, S., Onlu, H. 2010. Use of the Different Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) Methods in the Characterization of Human Pathogenic *Staphylococcus aureus* strains. Asian J. Chem., 22(4): 3173-3185.
- Berber, I., Avsar, C., Yegin, Z., Civek, S. 2015. Characterization of Environmental *Bacillus* Isolates by Protein Fingerprinting and Random Amplified Polymorphic

- DNA Profiles. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 1-13.
- Berber, I., Berber, S. 2006. Numerical analysis of SDS-PAGE Protein Patterns of Facultative Alkaliphilic *Bacillus* Species Isolated from Lake Van, Turkey, Fresen. Environ. Bull., 15: 409-416.
- Berber, I., Cokmus, C., Atalan, E. 2003. Characterization of *Staphylococcus* Species by SDS-PAGE of Whole Cell and Extracellular proteins. Microbiol., 72:42-47.
- Berber, I., Ekin, S. 2008. Discrimination and numerical analysis of human pathogenic *Candida albicans* strains based on SDS-PAGE protein profiles. Afr. J. Biotech., 7(4): 425-429.
- Berber, İ., Çökmüş, C., Atalan, E. 2003. Characterization of *Staphylococcus* Species by SDS-PAGE of Whole-Cell and Extracellular Proteins. Microbiology, 72:42-47.
- Berber, İ., Yenidünya, E. 2005. Identification Of Alkaliphilic *Bacillus* Species Isolated From Lake Van And Its Surroundings By Computerized Analysis Of Extracellular Protein Profiles. Turkish Journal of Biology, 29(3), 181-188.
- Bernfeld P. 1955. Amylases α - And β -Methods. Enzymology; 1:149-58.
- Bhardwaj, M., SATYANARAYANA, T. 2005. Extracellular highly alkaline and cold active protease of a psychrophile *Bacillus* sp. MLB-2. Int.Conf. Microb. Divers., University of Delhi, New Delhi. India, 164.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A., Osman, G., 2003. Enzymatic Properties Of A Novel Thermostable, Thermophilic, Alkaline and Chelator Resistant Amylase From An Alkaliphilic *Bacillus* Sp. Isolate ANT-6. Process Biochem., 38: 1397-1403.
- Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Sasipreeyajan, J., Svenson, S.B. 2001. Differentiation of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Strains by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. Vet. Microbiol., 80: 75-83.
- Clark, D. 2005. Molecular Biology, Elsevier Academic Press, Southern Illinois University, USA, p. 802.
- Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Swings, J., 2005. Towards a Prokaryotic Genomic Taxonomy. FEMS Microbiol. Rev., 29: 147-167.

- Coskun, A. 2010. Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 115 s.
- Coutinho, P.M., Reilly, P.J. 1997. Glucoamylase Structural, Functional, and Evolutionary Relationships. *Proteins*, Volume 29, Issue 3. 334-347s.
- Das, A., Bhattacharya, S., Murali, L. 2010. Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolated from cow dung. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 8(6):685-691.
- Delgado, S., Mayo, B. 2004. Phenotypic And Genetic Divercity Of *Lactococcus lactis* And *Enterococcus* spp. Strains İsolated From Northern Spain Starter-Free Farmhouse Cheeses. *International Journal Of Food Microbiology*, (90); 309-319.
- Demain A.L., Solomon, N.A. 1981. Industrial microbiology: Introducing an Issue on How Products Useful to Man are Manufactured by Micro-Organisms. *Sci.Am*, 245:43-51.
- Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G., Wen, T. 2010. Purification And Characterization Of A Surfactant-Stable High-Alkaline Protease From *Bacillus* sp. B001. *Bioresource Technology*, 101(18), 7100-7106.
- Dorneles, E.M., Santana, J.A., Ribeiro, D., Dorella, F.A., Guimarães, A.S., Moawad, M.S., Selim, S.A., Garaldi, A.L.M., Miyoshi, A., Ribeiro, M. G., Gouveia, M.G., Azevedo, V., Heinemann, M.B. & Lage, A.P. (2014). Evaluation of ERIC-PCR as Genotyping Method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolates. *PLoS One*, 9, e98758.
- Egas, M.C.V., da Costa MS, Cowan DA, Pires EMV. 1998. Extracellular A-Amylase From *Thermus filiformis* Ork A2: Purification And Biochemical Characterization. *Extremophiles*;2:23/32.
- Ekici, K., Akyüz, N. 2003. Farklı Hayvan Türlerine Ait Çiğ Etlerin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14(2), 78-82.
- Erem, F., Certel, M., Karakas, B. 2009. Identification of *Bacillus* species Isolated from Ropey Breads Both with Classical Methods and API Identification Kits. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakultesi Dergisi*, 22(2), 201-210.
- Gajbhiye, A., Rai, A. R., Meshram, S. U., Dongre, A. B. 2010. Isolation, Evaluation and Characterization of *Bacillus subtilis* From Cotton Rhizospheric Soil with

- Biocontrol Activity Against *Fusarium oxysporum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(7), 1187-1194.
- Gaur, R., Tiwari, S. 2015. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG07. BMC biotechnology, 15(1), 1.
- Ghorbel R.E., Maktouf S., Massoud E.B., Bejar S., Chaabouni S.E. 2009. New Thermostable Amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a Broad pH Applicability. Applied Biochemistry and Biotechnology. Volume 157, Issue 1, pp 50-60.
- Gözükara, F., 2009. Termofil *Bacillus* sp. Bakterisinden Lichenaz (B-1,3 Ve 1,4 Glucanase) Enzimi Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Kullanılabilirliği. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Güneş, K. 2006. Klinik Örneklerde PZR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu Restriksiyon Bölümünün Uzunluk Değişkenliği) Yöntemi Kullanılarak *Leishmania* Parazitlerinin Tür Tayini. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 183 s.
- Güney, E. 2014. *Bacillus* sp. Türlerinde Siderofor Üretimi ve *Bacillus cereus* dsm 4312'de Siderofor Üretiminin Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, 76s.
- Güven, G.R. 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açidan Önemli Bazı Enzimleri. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR. Cilt: 09, Sayı: 1-10.
- Haliskaranfil, S. 2012. Termoalkalifilik Amilaz ve selülaz enzim (Multi Enzim) Üreticisi *Bacillus* sp. İzolasyonu, Enzimlerin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliği. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 163s.
- Han, Q.Q., Lü, X.P., Bai, J.P., Qiao, Y., Paré, P.W., Wang, S.M., Zhang, J.L., Wu, Y.N., Pang, X.P., Xu, W.B., Wang, Z. L. 2014. Beneficial Soil Bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) Augments Salt Tolerance Of White Clover. Frontiers In Plant Science, 5, 525.
- Han, X., Shiwa, Y., Itoh, M., Suzuki, T., Yoshikawa, H., Nakagawa, T., Nagano, H. 2013. Molecular Cloning And Sequence Analysis Of An Extracellular Protease From Four *Bacillus subtilis* Strains. Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry, 77(4), 870-873.

- Harmsen, D., Karch, H. 2004. 16S rDNA For Diagnosing Pathogens: A Living Tree. Am. Soc. Microbiol. New., 70: 19–24.
- Huang X.P., Monk C. 2004. Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. nov. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 20:85-92.
- Huang, R., Su, R., Qi, W., He, Z. 2011. Bioconversion of Lignocellulose into Bioethanol: Process Intensification and Mechanism Research. Bioenerg. Res. 4: 225-245.
- Ibrahim, A. S., Al-Salamah, A. A., El-Badawi, Y. B., El-Tayeb, M. A., Antranikian, G. 2015. Detergent-, Solvent-and Salt-Compatible Thermoactive Alkaline Serine Protease From Halotolerant Alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15: Purification And Characterization. Extremophiles, 19(5), 961-971.
- Janecek, S., 2009. Amylolytic Enzymes-Focus on the Alpha-Amylases from Archeae and Plants. Nova Biotechnologia 9-1.
- Kalkan, S. 2006. Çiğ Sütte *Bacillus Cereus* Sayılması İçin Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 59s.
- Kalkan, S. 2006. Çiğ Sütte *Bacillus Cereus* Sayılması İçin Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 59 s.
- Kalkan, S., Halkman K. 2006. *Bacillus cereus* ve içme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 4(1), 1-11.
- Karcioğlu, L. 2011. Topraktan Amilaz Üreten *Bacillus* İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 61 s.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. 2008. A Rapid And Easy Method For The Detection of Microbial Cellulases On Agar Plates Using Gram's İodine. Current Microbiology, 57(5), 503-507.
- Kaynar, P., Beyatlı Y. 2006. Balıklardan İzole Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi. Orlan On-Line Mikrobiyoloji Dergisi.

- Kılıçer, H.R. 2014. Yem Katkısı Selüloz Enzimlerini Üreten Termofilik *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Osmaniye, 50s.
- Kıran, E.Ö., Çömlekçioğlu U., Dostbil N. 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi,9(1).
- Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö. 2011. Laktik asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27(1):62-74.
- Kıran, Ö.E., Çömlekcioglu, U. 2003. Zeytinli Ilıcası (Kahramanmaraş)'ndan Termofil Alkalifilik Amilolitik *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Amilaz Üretme Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi. KSÜ Fen Bilimleri ve Mühendislik Dergisi, 6(2):41-48.
- Kumar G. S., Chandra M. S., Mallaiah K. V., Sreenivasulu P., Choi Y.L. 2010. Purification And Characterization Of Highly Thermostable α -amylase From Thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 15:435-440.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Cummings, N. J., Daniel, R. A., Denizot, F., Devine, K. M., Dusterhoft, A., Ehrlich, S. D., Emmerson, P. T., Entian, K. D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S. Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E. J., Grandi, G., Guiseppe, G., Guy, B. J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C. R., Henaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M. F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., KlaerrBlanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S. M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauel, C., Medigue, C., Medina, N., Mellado, R. P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., Oreilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S. H., Parro, V., Pohl, T. M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A. M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger,

- M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S. J., Serror, P., Shin, B. S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H. F., Zumstein, E., Yoshikawa, H., and Danchin, A., 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nature* 390, 249-256
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227:680-685.
- Lee, Y., Eun, C. S., & Han, D. S. 2016. Clinical *Fusobacterium Mortiferum* Isolates Cluster With Undifferentiated *Clostridium Rectum* Species Based on 16S rRNA Gene Phylogenetic Analysis. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 46(3), 279-281.
- Lenette, E.H., Ballows, A., Hausler, J.W.Jr., Shadomy, J.H. 1985. *Manuel of Clinical Microbiology*. Vol4.USA.1149s.
- Li, X., Yu, H.Y. 2012. Purification and characterization of an organic-solventtolerant cellulase from a halotolerant isolate, *Bacillus* sp. L1. *J Ind Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s10295-012-1120-2.
- Lin, Y., Wei, W., Yuanyuan, P., Fuping, L. 2012. Screening and identification of cellulase-producing strain of *Fusarium oxysporum*. *Procedia Environmental Sciences*, 12:1213-1219.
- Liu, J., Zhang, Z., Liu, Z., Zhu, H., Dang, H., Lu, J., And Cui, Z. 2011. Production of cold-adapted amylase by marine bacterium *Wangia* sp. C52: Optimization, modelling, and partial characterization. *Mar Biotechnol*, 13(5):837-844.
- Liu, X.D. Xu, Y. 2008. A Novel Raw Starch Digesting A-Amylase From A Newly Isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification And Characterization. *Bioresource Technology*, 99(10), 4315-4320.

- Lo H.F., Lin, L.L., Chen, H.L., Hsu, H.H., Chang, C.T. 2001. Enzymatic Properties Of A SDS-Resistant *Bacillus* sp. TS-23 α -Amylase Produced By Recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem*;36:743-50.
- Loh, C. Y., Tan, Y. Y., Rohani, R., Weber, J. F. F., & Bhore, S. J. 2013. Diversity of endophytic bacteria in Malaysian plants as revealed by 16S rRNA encoding gene sequence based method of bacterial identification. *Journal of Young Pharmacists*, 5(3), 95-97.
- Manfredi, A. P., Pisa, J. H., Valdeón, D. H., Perotti, N. I., Martínez, M. A. 2016. Synergistic Effect of Simple Sugars and Carboxymethyl Cellulose on the Production of a Cellulolytic Cocktail from *Bacillus* sp. AR03 and Enzyme Activity Characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-17.
- Marul, B. 2007. Lipaz Üretim Koşullarının ve Üretilen Enzimin Deterjan Endüstrisinde Kullanımının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 107s.
- McTigue, M.A., Kelly, C.T., Doyle E.M., Fogarty, W.M. 1995. The Alkaline Amylase Of The Alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370. *Enzyme Microb Technol* ;17:570/3.
- Mourad, K. 2007. Plasmid DNA Studies In *Lactobacillus Plantarum* Strain Isolated From Olive Fermentations: Production Of And Immunity To Plantaricin OL15 is Associated To A 9.6 Kb Plasmid (Pol15). *Grasas Aceites*, 2 (58); 136-141.
- Msadek, T. 1999. When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol*, 7,201-207.
- Nicholson, W. L., Setlow, B., & Setlow, P. (1990). Binding of DNA in vitro by a small, acid-soluble spore protein from *Bacillus subtilis* and the effect of this binding on DNA topology. *Journal of bacteriology*, 172(12), 6900-6906.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a Source of Novel Enzymes for Industrial Application. *Microbiology Biotechnology*. 51: 711729.
- Nouadri, T., Meraihi, Z., Shahrazed, D. D., & Leila, B. 2010. Purification And Characterization Of The-Amylase Isolated From *Penicillium camemberti* PL21. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(6), 155-162.

- O'sullivan, D.J., Klaenhammer, T.R. 1993. Rapid Mini-Prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environment Microbiology*, 59:8, 2730-2733.
- Olivera, N., Sequiros, C., Sineriz, F., BRECCIA, D.J. 2006. Characterization of alkaline proteases from a novel alkali-tolerant bacterium *Bacillus patagoniensis*. *World journal of Microbiology*. 22: 737-743.
- Özcan, D. 2015. Endüstriyel Kullanıma Uygun, Termostabil Rekombinant alfa amilaz ve beta amilaz Enzimlerinin Eş Zamanlı Bakteriyel Ekspresyon ile Üretilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, 72s.
- Özdemir, A., Sıdal, U. 2013. *Streptomyces* sp. MC10 Suşunun Alfa Amilaz Üretim Kabiliyetinin Belirlenmesi. 9.1. 39-46s.
- Punia, P., Kaushik, S., Jyoti, A. 2016. Optimization of Production Conditions and Partial Characterization of Extracellular Amylase from *Bacillus Subtilis* under Submerged Condition. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 75, 371-377.
- Rao, M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 597-635.
- Reddy, M.V.B., Sasikala, P., Karthik, A. 2012. Identification of *Escherichia coli* Isolates from Meat Samples by Antibiotic Susceptibility, Plasmid DNA and Whole Cell Protein Fingerprinting. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.*, 2(4): 705-712.
- Sahilah, A.M., Audrey, L.Y.Y., Ong, S.L., Wan Sakeenah, W.N., Safiyyah, S., Norrakiah, A.S., Aminah, A., Ahmad Azuhairi, A. 2010. DNA Profiling Among Egg and Beef Meat Isolates of *Escherichia coli* by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) and Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR), *Int. Food Res. J.*, 17: 853-866.
- Sarethy, I. P., Saxena, Y., Kapoor, A., Sharma, M., Seth, R., Sharma, H., Sharma, K.S., Gupta, S. 2013. Amylase Produced by *Bacillus* sp. SI-136 Isolated from Sodic-alkaline Soil for Efficient Starch Desizing. *Journal of Biochemical Technology*, 4(2), 604-609.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50:1-17.

- Secundo de Souza, A. I., Freitas Neto, O. C. D., Batista, D. F. A., Estupinan, A. L. D. P. C., Almeida, A. M. D., Barrow, P. A., Berchieri, A. 2015. ERIC-PCR Genotyping of Field Isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum. Avian Pathology, 44(6), 475-479.
- Sekin, Y., Karagözlü, N. 2006. Gıda Mikrobiyolojisi Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar. Literatür Yayıncılık, İstanbul, 358 s.
- Shafiei, M., Ziaee, A.A., Amoozegar, M.A. 2010. Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic α -amylase from a moderately halophilic bacterium, *Nesterenkonia* sp. Strain F. Process Biochemistry, 45:694-699.
- Shanmughapriya, S., Kiran, G.S., Selvin, J., Thomas, T.A., Rani, C. 2010. Optimization, Purification, and Characterization of Extracellular Mesophilic Alkaline Cellulase from Sponge-Associated *Marinobacter* sp. MSI032. Applied Biochemistry and Biotechnology, 162(3): 625-640.
- Singh, J., Batra, N., and Sobti, R. C., 2004. Purification and Characterisation of Alkaline Cellulase Produced by a Novel Isolated, *Bacillus sphaericus* JS1. J Ind MicrobiolBiotechnol. 31:51-56.
- Sofalian, O., Bandarian, P., Asghari, A., Sedghi, M., Firoozi, B. 2015. Identification of Seed Storage Protein Polymorphism in Some Soybean (*Glycine max* Merrill) Genotypes Using SDS-PAGE Technique. Yyu J Agr Sci.
- Souza, P.M., Magalhaes P.O. 2010. Application of Microbial α -amylase in Industry – A Review. Brazilian Journal of Microbiology. ISSN 1517-8382.
- Sriariyanun, M., Tantayotai, P., Yasurin, P., Pornwongthong, P., Cheenkachorn, K. 2016. Production, Purification and Characterization of An Ionic Liquid Tolerant Cellulase From *Bacillus* sp. Isolated From Rice Paddy Field Soil. Electronic Journal Of Biotechnology, 19, 23-28.
- Svec, P., Novakova, D., Zackova, L., Kukletova, M., Sedlacek, I. 2008. Evaluation of (GTP)₅-PCR for Rapid Identification of *Streptococcus mutans*. Antonie van Leeuwenhoek, 94(4),573-579.
- Temiz, A. 2008. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 291 s.

- Topçal, F., Dıǵrak, M., Gündoǵan, R. 2014. Topraktan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması ve Bakteriosin Üretimlerinin Belirlenmesi. Adıyaman Üniversitesi. Fen Bilimleri Dergisi 4(2),57-67.
- Tortoli, E. 2003. Impact Of Genotypic Studies On Mycobacterial Taxonomy: The New Mycobacteria Of The 1990s. Clin. Microbiol. Rev., 16: 319–354.
- Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C.R.K., Jha, B. 2011. Solvent Tolerant Marine Bacterium *Bacillus aquimaris* Secreting Orgenic Solvent Stable Alkaline Cellulase. Chemosphere, 83: 706-712.
- Turus, N. 2011. Alkali Soğukta Aktif Proteaz Üreticisi *Bacillus* spp. suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Enzimin Biyoteknolojik Kullanım Olanakları. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 77 s.
- Türker, C. 2014. α -amilaz Enzimlerini Üreten Termofilik *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Osmaniye, 66s.
- Türker, C. 2014. α -amilaz Enzimlerini Üreten Termofilik *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Osmaniye, 66 s.
- Uyar, F., Porsuk, I., Kizil, G., Yılmaz, E. I. 2011. Optimal Conditions For Production Of Extracellular Protease From Newly Isolated *Bacillus cereus* Strain CA15. Eurasian Journal Of Biosciences, 5(19.50).
- Uzumcu, Z., Caf, Y., Valipour, E., Maasoğlu, Y., Arıkan, B. 2013. Isolation of Cold Shock Protein profiles from *Pseudomonas* sp. Strains and Analyses of SDS-PAGE. Journal of Applied Biological Sciences, 7(2):33-36.
- Ünal, N., İstanbulluoğlu, E. 2009. İnsan ve Sığır Kökenli *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Özelliklerinin Araştırılması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakülte Dergisi, 56, 119-126.
- Valero, M., Hernández-Herrero, L. A., Fernández, P. S., Salmerón, M. C. 2002. Characterization of *Bacillus cereus* Isolates From Fresh Vegetables and Refrigerated Minimally Processed Foods by Biochemical and Physiological Tests. Food Microbiology, 19(5), 491-499.
- Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. 2002. Properties and Applications of Starch-Converting

- Enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, Volume 94, Issue 2, 137-155s.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. 1991. Distribution of Repetitive DNA Sequences in Eubacteria and Application to Fingerprinting of Bacterial Genomes. *Nucleic Acids Res.*, 19: 6823-6831.
- Vijayaraghavan, P., Arun, A., Al-Dhabi, N. A., Vincent, S. G. P., Arasu, M. V., Choi, K. C. 2016. Novel *Bacillus Subtilis* IND19 Cell Factory For The Simultaneous Production Of Carboxy Methyl Cellulase And Protease Using Cow Dung Substrate In Solid-Substrate Fermentation. *Biotechnology For Biofuels*, 9(1), 1.
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., Kolter, R., 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way, *Nature Reviews*, 157.
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., Kolter, R., 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way, *Nature Reviews*, 157.
- Voget, S., Steele, H.L., Streit, W.R. 2006. Characterization Of Metagenome-Derived Halotolerant Cellulase. *J Biotechnol* 126:26-36.
- Wang, Q.F., Miao, J.L., Hou, Y.H., Xu, Z., Miao, J.L., Li, I.G, Y., 2008. Purification and Properties of an Extracellular Cold-Active Protease from the Psychrophilic *Bacterium Pseudoalteromonas* sp.NJ276. *Biochemical Engineering Journal*. 38: 362- 368.
- Wang, S.L., Chao, C.H., Liang, T.W., Chen, C. C. 2009. Purification and Characterization of Protease And Chitinase From *Bacillus cereus* TKU006 and Conversion of Marine Wastes By These Enzymes. *Marine Biotechnology*, 11(3), 334-344.
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Macke, T.J., Fox, G.E. 1985. A Phylogenetic Definition Of The Major Eubacterial Taxa. *Sys. Appl. Microbiol.*, 6: 143–151.
- Wolfgang, A. 2004. *Enzymes in industry: Production and applications*. WILEYVCH Verlag GmbH&Co. KgaA, Weinheim.
- Yang, D., Weng, H., Wang, M. 2010. Cloning and Expression of a Novel Thermostable Cellulase from Newly Isolated *Bacillus subtilis* strain I15. *Mol. Bio. Rep.* 37:1923-1929.

- Yang, D., Weng, H., Wang, M., Xu, W., Li, Y., Yang, H. 2010. Cloning and Expression of a Novel Thermostable Cellulase from Newly Isolated *Bacillus subtilis* Strain I15. *Molecular Biology Reports*, 37: 1923-1929.
- Yang, S.J., Lee, D.H., Park, H.M., Jung, H.K., Park, C.S., Hong, J.H. 2014. Amylase Activity and Characterization of *Bacillus subtilis* CBD2 Isolated from Doenjang. *Korean Journal of Food Preservation*, 21(2), 286-293.
- Yişil, H.N. 2014. *Bacillus thuringiensis*'in Yumuşak Çelik Üzerindeki Aktivitesi. Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde, 98s.
- Yişil, H.N. 2014. *Bacillus thuringiensis*'in Yumuşak Çelik Üzerindeki Aktivitesi. Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde, 98 s.
- Zaidi, N., Konstantinou, K., Zervos, M. 2003. The role of Molecular Biology and Nucleic Acid Technology in the Study of Human Infection and Epidemiology, *Arch. Pathol. Lab.*, 127: 1098-1105.
- Zhao, X.H., Wang, W., Wang, F.Q., Wei, D.Z. 2012. A comparative study of β -1,4-edoglucanase (possessing β -1,4-exoglucanase activity) from *Bacillus subtilis* LH expressed in *Pichia pastoris* GS115 and *Escherichia coli* Rosetta (DE3). *Bioresource Technology*, 110:539-545.
- Zoppas, M.P., Meneguzzi, A., Tramontina, F. 2013. Alternativesfor Cellulase Production in Submerged Fermentation with Agroindustrial Wastes. *International Journal of Modern Engineerring Research (IJMER)*. Vol. 3, Issue. 4, Jul. – Aug. 2013 pp-2374-2381. ISSN: 2249-6645.

7. EKLER

EK-1. Suşların Tanısında Kullanılan Besi Yerleri

1. Nutrient Agar

Nutrient Agar	20 g
Distile Su	1000 ml
pH	7,0±0,2

Besiyeri 20 g/l olacak şekilde tartılıp 1 l distile su içinde çözündürülür. 121°C’de 15 dk sterilize edilir ve steril petri kutularına dökülür.

2. MR-VP Broth (Merck)

MR-VP (Merck)	17 g
Distile Su	1000 ml
pH	7,0

Gerekli miktarlar tartılıp 1 l distile suda süspanse edilerek eritilir. Tüplere dağıtılır ve otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir.

3. Triple Sugar Iron Agar (TSI)

Triple Sugar Iron Agar (Merck)	65 g
Distile Su	1000 ml
pH	7,3 ± 0,2

Besi yerinden 65 g tartılarak 1 l distile suya ilave edilip kaynar su banyosunda 5-10 dk tutularak iyice eritilir. Daha sonra tüplere dağıtılan besi yeri 121°C’de 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyondan sonra tüpler 1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılarak

katılaşmaları beklenir. Sonuçta katılaşan besi yerleri parafilm ile kaplanarak buzdolabında saklanır.

4. Nitrate Broth (NB)

Nitrate Broth (Acumedia)	23 g
Distile Su	1000 ml
pH	7,0

Dehidre besi yeri 23 g olacak şekilde gerekirse ısıtılarak distile su içerisinde çözülür. İçerisinde durham tüpü bulunan tüplere 10'ar ml dağıtılıp otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilir.

EK-2. Araştırmada Kullanılan Boya ve Diğer Çözeltiler

1. Kristal Viyole

Kristal Viyole	10 g
Etil Alkol (%95'lik)	100 ml

2. Lügol

İyot	1 g
Potasyum İyodür	2 g
Distile su	300 ml

3. Bazik Fuksin

Bazik Fuksin	3 g
Etil Alkol (%95'lik)	100 ml

4. Serum Fizyolojik

Sodyum Klorür	8,5 g
Distile su	1000 ml

5. İyot Çözeltisi

İyot	1 g
KI	2 g
Distile Su	100 ml

KI suda çözündükten sonra iyot ilave edilir ve çözmeye devam edilir. Membran filtreden geçirilip renkli şişede 2-3 hafta bekletilebilir.

6. Alfa-naftol Çözeltisi

Alfa-naftol	5 g
Etil Alkol	100 ml

7. KOH çözeltisi (%40)

Potasyum Hidroksit	40 g
Distile Su	100 ml

8. Metil-Red Ayıracı

Metil Red	0,050 g
Etil Alkol (%95)	150 ml
Saf Su	100 ml

Metil Red, alkolde eritildikten sonra distile su eklenerek çözülür. Oda sıcaklığında saklanabilir.

9. Katalaz Test Ayıracı

Hidrojen peroksit (H_2O_2) (%30'luk)'den 3 ml alınarak 97 ml distile su ile iyice karıştırılır.

EK-3. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

1. Akrilamid + N,N'-Metilen Bis-akrilamid Monomer Stoğu

Akrilamid (Oxoid)	28,8 g
Bis-akrilamid (Oxoid)	1,2 g

Maddeler gerekli miktarda tartılıp 75 ml distile su içersinde çözülerek son hacim 100 ml'ye tamamlanır. Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek renkli cam şişede + 4°C'de saklanır.

2. Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris-HCL, pH 8,6)

Gerekli miktar trizma bazı tartılarak bir miktar distile suda çözüldükten sonra 1N HCl ile pH 8,6'ya ayarlanır. Son hacim tamamlandıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülür ve + 4°C'de saklanır. SDS-PAGE için %0,4 oranında SDS ilave edilir.

3. Yığıma Jel Tamponu (0,5 M Tris-HCL, pH 6,8)

Gerekli miktar trizma bazı tartılarak bir miktar distile suda çözüldükten sonra 1N HCl ile pH 6,8'e ayarlanır. Son hacim tamamlandıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülür ve + 4°C'de saklanır. SDS-PAGE için %0,4 oranında SDS ilave edilir.

4. Tank Buffer

Trizma Bazı (Sigma)	1,21 g
Glisin	5,76 g

Maddeler 1000 ml distile suda çözülür. SDS- PAGE için %0,1 oranında SDS ilave edilir.

5. Laemmli Buffer (X4)

0,5 M Tris-HCl pH 6,8	5,12 ml
Gliserin (Merck)	8,00 g
Distile Su	3,00 ml
SDS	2,00 g
2-β-Merkaptoetanol	4,00 ml
Bromo Fenol Mavisi (Merck)	0,025 g

Gerekli miktarlar tartılıp temiz bir deney tüpü içerisinde homojen hale getirilir ve gün ışığına maruz bırakılmadan saklanır.

6. Boyama Çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue (Sigma)	1,5 g
İzopropil Alkol (Merck)	250 ml
Asetik Asit (Merck)	100 ml
Distile Su	650 ml

Boya çözündükten sonra Whatman No:1 filtre kâğıdından süzülür ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanır.

7. Boya Çıkarma Çözeltisi

İzopropil Alkol (Merck)	250 ml
Asetik Asit (Merck)	100 ml
Distile Su	650 ml

Gerekli miktarlar tartılarak 650 ml distile suda çözündürülür. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında renkli cam şişede saklanır.

8. Jel Saklama Çözeltisi

Jel saklamak amacıyla %7'lik Glasial Asetik Asit çözeltisi kullanılır.

9. %10'luk Amonyum Per Sülfat (APS)

APS	1 g
Distile Su	10 ml

Gerekli miktarlar tartılarak distile suda çözülür ve + 4°C'de saklanır. Bir haftadan sonra taze hazırlanarak kullanılır.

10. %10'luk SDS-PAGE Ayırma Jel İçeriği

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	8,78 ml
Distile Su	10,84 ml
1,5 M Tris-HCL pH 8,6	6,58 ml
APS (Sigma)	100,00 µl
TEMED (Oxoid)	10,00 µl

Gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezin alt kısma aktarılır.

11. %12'lik SDS-PAGE Ayırma Jel İçeriği

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	12 ml
Distile Su	10,5 ml
1,5 M Tris-HCL pH 8,6	7,8 ml
APS (Sigma)	125,00 µl
TEMED (Oxoid)	10,00 µl

Gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezin alt kısma aktarılır.

12. %4'lük SDS-PAGE Yığma Jel İçeriği

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	0,81 ml
Distile Su	2,95 ml
0,5 M Tris-HCL pH 6,8	1,235 ml
APS (Oxoid)	50,00 µl
TEMED (Oxoid)	6,00 µl

%10'luk SDS-PAGE polimerleştikten sonra, yukarıdaki maddelerden gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezde %10'luk SDS-PAGE kısmın üzerine aktarılır. Polimerleşme başlamadan en kısa zamanda hava boşluğu bırakılmadan tarak yerleştirilir.

EK-4. Plazmid Analizinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. %25 Sukroz içeren 30 mg/ml Lizozim Çözeltisi

%25 sükröz, 30 mg/ml alınır distile su ile 100 ml tamamlanır.

2. %3 SDS, 0,2 N NaOH

0,1 g SDS ve 0,0016 g NaOH alınır ve distile su ile 10 ml tamamlanır.

3. 3 M Sodyum Asetat:

4,0824 g sodyum asetat distile su ile 10 tamamlanır ve pH: 4,8'e ayarlanır.

4. 7,5 M Sodyum Asetat

5, 781 g amonyum asetat distile su ile 10 ml tamamlanır.

5. Fenol:Kloroform Solüsyonu

1:1 oranına göre karıştırılarak hazırlanır.

6. RNaz Solüsyonu

0,005 g RNaz tartılıp 1 ml distile su ile tamamlanır.

7. Tris-Borat EDTA (TBE) Solüsyonu: 1X, pH 8,0

Trizma Bazı (Sigma)	10,8 g
Asit Borik (Sigma)	5,5 g
0,5 M EDTA, pH 8,0	4 ml
Distile su	1000

8. Y¼kleme Sol¼syonu (Loading Buffer)

¼re (Merck)	4 M
EDTA Merck)	0,025 M
S¼kroz (Sigma)	%60
Bromfenol Blue (Sigma)	%0,025
Ksilen (Merck)	%0,025



EK-5. Genomik DNA Analizinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

1. Tris-EDTA (TE) Solüsyonu: 10 mM Tris-HCL pH 8, 1 mM EDTA

1 ml 1 M Tris-HCL pH 8,

0,5 ml 1 M EDTA pH 8,0 alınır ve distile su ile 100 ml tamamlanır.

2. SDS, %10

10 g SDS alınır ve distile su ile 100 ml tamamlanır.

3. 5M NaCl

141,6 g NaCl alınır ve distile su ile 500 ml tamamlanır.

4. Proteinaz K

0.004 g Proteinaz K tartılır ve 2 ml distile su eklenir.

5. Fenol:kloroform solüsyonu

1:1 oranına göre karıştırılarak hazırlanır.

6. Tris-Borat EDTA (TBE) Solüsyonu: 1X, pH 8,0

Trizma Bazı (Sigma)	10,8 g
Asit Borik (Sigma)	5,5 g
0,5 M EDTA, pH 8,0	4 ml
Distile su	1000

7. Yükleme Solüsyonu (Loading Buffer)

Üre (Merck)	4 M
EDTA Merck)	0,025 M
Sükroz (Sigma)	%60
Bromfenol Blue (Sigma)	%0,025
Ksilen (Merck)	%0,025



EK-6. Kullanılan Cihazlar

Cins	Marka	Model
Mikrodalga Fırın	Arçelik	MD 595
Elektroforez Güç Kaynağı	Supply Consort	EV 232
Yatay Elektroforez	Thermo Scientific	MS1509112955
Dikey Elektroforez	Hoefer	SE400-USA
Tarayıcı	HP Scan-jet	G2410
Santrifüj Cihazı (15.000 rpm)	Hanil Science Industrial	HM-150IV
Hassas Terazî	AND	GR-200
pH Metre	Hanna Instruments	HI 221
Işık Mikroskobu	Leica	DM 500
PCR	Techne	TC-5000
Vorteks	Biosan	Bio Vorteks VI
Manyetik Karıştırıcı	Biocote (Stuart)	SB 162
İnkübatör	Nüve	EN 500
Sterilizatör	Nüve	FN 500
Otoklav	Tuttnauer	3850 MLV
UV Transilluminatör	Cleaver	
Karıştırıcı	Waring	

EK-7. Enzimler İle İlgili Tampon, Çözelti, Boya ve Solüsyonlar

1. M9-Nişasta Agarı

Amilaz aktivitesinin saptanması ve enzim üretimi amacıyla kullanılmıştır.

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	6
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.24
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0.24
Pepton	3
Nişasta 10	10
Agar	15
Bileşimi	g/L

2.CMC-Agar

Selüloz aktivitesinin belirlenmesi ve enzim üretimi amacıyla kullanılmıştır.

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1.18
KH ₂ PO ₄	0.9
NaNO ₃	1
KCl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
Maya Özütü	0.5
Pepton	0.5
CMC	10
Bileşimi	g/L

3. Skimmilk-Agar

Proteaz enzim aktivitesi için kullanılmıştır.

Pepton	10
Et Özütü	3
NaCl	5
Skimmilk	11
Agar	15
Distil su	1
Bileşimi	g/L

4. Kongo Red (%0.1)

Katı besi yeri ve SDS-PAGE jelinde selüloz aktivitesinin gösterilmesi için %0.1'lik kongo kırmızısı 100 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

5. Sodyum-Fosfat Tamponu

Enzimlerin pH 6.0-8.0 arasındaki aktivite düzeylerinin saptanmasında kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0.2M NaH_2PO_4 ile 0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri ve distile sudan uygun hacimlerde karıştırılarak, istenilen pH değerine sahip yeni bir karışım elde edilir.

pH	0.2 M NaH_2PO_4	0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Distile Su
6.0	87.7	12.3	100
6.5	68.5	31.5	100
7.0	39.0	61.0	100
7.5	16.0	84.0	100
8.0	5.3	94.7	100

6. Glisin-NaOH Tamponu

Enzimlerin pH 8.5-10.5 aralığındaki aktivitelerini saptamak için kullanılır. Tamponun hazırlanmasında 0.2M Glisin ile 0.2M NaOH çözeltileri ve distile su'dan uygun hacimlerde karıştırılarak, istenilen pH değerine sahip yeni bir karışım elde edilir.

pH	0.2 M Glisin	0.2M NaOH	Distile Su
8.5	4.0	50	146
9.0	8.8	50	141.2
9.5	22.4	50	127.6
10.0	32.0	50	118
10.5	45.5	50	104.5

7. Borax-NaOH Tamponu

Enzimlerin pH 11.0-12.5 arasındaki aktivitelerini saptamak amacı ile kullanılır. Tamponu hazırlamak için 0.05M Boraks (19.05g/L) çözeltisinden 50 mL alınarak üzerine istenilen pH değeri elde edilinceye kadar (0.2M NaOH ve yüksek pH değerleri için de 2N NaOH) uygun NaOH çözeltisinden eklenerek son hacim 200 mL olacak şekilde distile su ilave edilir.

8. Dinitro Salisilik Asit (DNS)

Enzim aktivitesi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek amacı ile kullanılır. 1g DNS 50 mL distile su içerisinde çözülür. Üzerine 30g K-Na-Tartarat ve 20 mL 2N NaOH ilave edilerek son hacim 100 mL ye tamamlanır.

9. Trikloro Asetik Asit (TCA)

Proteaz enzim aktivitesini durdurmak için kullanılmıştır 10 g TCA 60 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

9. %12'lik SDS-PAGE Ayırma Jel İçeriği

Zimogram analizlerinde %3'lük CMC ve Nişasta substratından 1 mL, %10'luk jelatin substratından 0.4 mL ayırma jeline eklenir.

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	8 ml
Distile Su	7 ml
1,5 M Tris-HCL pH 6,8	5 ml
APS (Oxoid)	66 µl
TEMED (Oxoid)	13 µl

10. SDS-PAGE ve Zimogram Dengeleyici Jel İçeriği

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	1.5 ml
Distile Su	5.25ml
0,5 M Tris-HCL pH 6,8	2.25 ml
APS (Oxoid)	30 µl
TEMED (Oxoid)	7.5 µl

11. SDS-PAGE'de Zimogram Analizleri İçin Renatürasyon Solüsyonları

Renatürasyon Solüsyonu-1 (pH:7.5): 10 mM Tris, 5 mM β -Merkaptoetanol ve %20 izopropanol karıştırılarak istenilen miktarda hazırlanır.

Renatürasyon Solüsyonu-2 (pH:7.5): 50 mM Tris, 5 mM β -Merkaptoetanol ve 1mM EDTA karıştırılarak istenilen miktarda hazırlanır.

Renatürasyon Solüsyonu-3 (pH:6.8): 50 mM sodyum fosfat tamponu şekilde hazırlanır.

12. Triton-X100 çözeltisi (Sol-1)

Elektroforez işleminden sonra proteaz enziminden SDS'nin uzaklaştırılması için kullanılır. Bu amaçla %2.5 Triton-X100 hazırlanır ve 1 saat süreyle inkübe edilir.

12. Tris-HCl çözeltisi (Sol-2)

Elektroforez işleminden sonra jeldeki proteaz enziminin aktive olması için kullanılır. Sol-1’de muamele edilen jel 50 mM Tris-HCl (pH:7.5) tamponunda 40°C’de 30 dakika inkübe edilerek enzimin aktivite göstermesi sağlanır.

13. Nişastalı Glisin-NaOH Tamponu (pH:10.0) Çözeltisi

Native PAGE elektroforezde gerçekleştirilen analiz sonucunda, jeldeki amilaz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanılır. Bu amaçla 50 mM Glisin-NaOH tamponuna (pH:10.0) son konsantrasyon %1 (w/v) olacak şekilde çözünür nişasta eklenerek hazırlanır.

14. Bütanol-Asetik Asit-Distile Su

Amilaz enzimine ait reaksiyon ürünlerinin saptanması amacıyla yapılan ince tabaka kromatografi çalışmalarında geliştirme solüsyonu olarak kullanılmıştır. Bütanol-asetik asit-distile su, 3:1:1 (v/v/v) şeklinde hazırlanır.

15. %20’lik Sülfirik Asit (H₂SO₄) Çözeltisi

80 mL Etil alkol (%96) içerisine 20 mL H₂SO₄ çözeltisi eklenerek hazırlanır.

16. Kloroform-Asetik Asit-Distile Su Çözeltisi

Selüloz enzimlerine ait hidroliz ürünlerinin belirlenmesinde hareketli faz olarak kullanılmıştır. Kloroform-asetik asit-distile su (6:7:1 v/v/v) karıştırılarak hazırlanır.

17. Anilin-Difenilamin-Ortofosforik Asit Çözeltisi

Anilin (%1) ve v/v-difenilamin (%1) w/v-aseton içerisinde çözüldükten sonra karışıma, çözeltideki konsantrasyonu %10 olacak şekilde ortofosforik asit (v/v) ilave edilir.

EK-8. 16S rRNA Dizi Analizi

>4 Numaralı Suşun 16S rRNA Dizi Analizi

TTGGGCGTAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
GGCT
CAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAG
AGTGG
AATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG
CGAA
GGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG
AACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA
GGGG
GTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TAC
GGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGC
ATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT
CTG
ACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGC
ATGG
TTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACC
CTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTG
ACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG
GGCT
ACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTA
AGCCA
ATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTG
AAG
CTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCC
TTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGT
GAGG
TAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAAT

>9 Numaralı Suşun 16S rRNA Dizi Analizi

TTGGGCGTAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCAC
GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGA
GGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTA
ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGA
GATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTG
TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG
ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACC
GCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCT
GCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACG
AGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGAAGCCAGCCGC
CTAAG

>12 Numaralı Suşun 16S rRNA Dizi Analizi

CGGATATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA
AAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG
TGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTAC
ACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTT
AGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC
CTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAG
GTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCA
CTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAC
GGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCG
TTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGT
GGGGTAACCTTTTGGA

8. ÖZGEÇMİŞ

Hilal KOYUNCU, 1990 yılında Sinop'ta doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Sinop'ta tamamladı. 2009 yılında girdiği Sinop Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl bölümünde yüksek lisansına başladı.

