ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Fakhraddin KHODAYARI

YEM KATKISI OLARAK KULLANILAN ENZİMLERİ ÜRETEN YENİ BAKTERİ SUŞLARININ İZOLASYONU, MUTASYONU VE ENZİM ÜRETİMİNDEKİ ETKİNLİKLERİNİN SAPTANMASI

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEM KATKISI OLARAK KULLANILAN ENZIMLERI ÜRETEN YENI BAKTERI SUŞLARININ IZOLASYONU, MUTASYONU VE ENZIM ÜRETIMINDEKI ETKINLIKLERININ SAPTANMASI

Fakhraddin KHODAYARI

DOKTORA TEZİ

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 20/06/2013 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....	.....	.....
Prof.Dr. Zeynel CEBECİ	Yrd. Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN	Prof.Dr. Numan ÖZCAN
DANIŞMAN	2. DANIŞMAN	ÜYE

.....	.....
Prof.Dr. Burhan ARIKAN	Yrd.Doç.Dr. Makbule BAYLAN
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Zootekni Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2011D22

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

YEM KATKISI OLARAK KULLANILAN ENZİMLERİ ÜRETEN YENİ BAKTERİ SUŞLARININ İZOLASYONU, MUTASYONU VE ENZİM ÜRETİMİNDEKİ ETKİNLİKLERİNİN SAPTANMASI

Fakhraddin KHODAYARİ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Zeynel CEBECİ
İkinci Danışmanın : Yrd. Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
Yıl: 2013, Sayfa: 120
: Prof. Dr. Zeynel CEBECİ
Jüri : Prof. Dr. Numan ÖZCAN
: Prof. Dr. Burhan ARIKAN
: Yrd. Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
: Yrd. Doç. Dr. Makbule BAYLAN

Bu çalışma ile alkalifilik, halofilik ve termofilik *Bacillus* sp suşları V-41 (amilaz^{+}), KH-13 (amilaz^{+}, ksilanaz^{+}) ve CU-48 (amilaz^{+}, CMCaz^{+}) izole edilmiş ve kısmi karakterizasyonları yapılmıştır. İzolatların türlerinin tanımlanması 16S rRNA dizi analizi ile yapılmıştır. Her üç izolat da Ethidium Bromid (EtBr) ile mutasyona uğratılmış ve üçünden de dörder adet mutant varyete elde edilmiştir. V-41 suşundan elde edilen V41-M4 mutant varyetesinde α-amilaz aktivitesinin orijinal suşa göre %90.9 oranında daha yüksek olduğu görülmüştür. KH-13 izolatından elde edilen KH13-M3 mutant varyetesinin %15.74 oranında daha yüksek α-amilaz, KH13-M4 mutant varyetesinin ise %35.08 oranında daha yüksek ksilanaz aktivitesi olduğu görülmüştür. CU-48 izolatından elde edilen CU48-M2 mutant varyetesi ise orjinal bakteriye göre %101.32 oranında daha fazla α-amilaz aktivitesi göstermiştir. Zimogram analizleri ile enzimlerin moleküler ağırlıkları; V-41 α-amilaz için 70 kDa, KH-13 α-amilaz ve ksilanazı için 66 ve CU-48 α-amilaz için 45 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimlerin spesifik aktiviteleri araştırılmış ve V41-M4 α-amilazı için 1.27 µmol mg^{-1} dk^{-1}, KH-13 α-amilaz ve ksilanazı için sırasıyla 5.35 ve 2.58 µmol mg^{-1} dk^{-1}, ve son olarak CU-48 α-amilaz ve CMCazı için sırasıyla 4.4 ve 1.30 µmol mg^{-1} dk^{-1} olarak belirlenmiştir. Son olarak enzimlerin kısmi karakterizasyonları da yapılmış ve zamana göre enzim aktiviteleri de belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, İzolasyon, α-Amilaz, CMCaz, Ksilanaz, Mutasyon

ABSTRACT

PhD THESIS

ISOLATION, MUTATION AND ENZYME PRODUCTION POTENTIAL OF NOVEL BACTERIA PRODUCING ENZYME USED AS FEED ADDİTİVES

Fakhraddin KHODAYARİ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE

Supervisor	: Prof. Dr. Zeynel CEBECİ
Second Supervısor	: Asst. Prof. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
	Year: 2013, Pages: 120
	: Prof. Dr. Zeynel CEBECİ
Jury	: Prof. Dr. Numan ÖZCAN
	: Prof. Dr. Burhan ARIKAN
	: Assist. Prof. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
	: Assist. Prof. Dr. Makbule BAYLAN

In this study alkalifilik, halophilic and thermophilic strains of *Bacillus* sp V-41 (amylase^{+}), KH-13 (amylase $^{+}$, xylanase^{+}) and CU-48 (amylase $^{+}$, CMCaz^{+}) were isolated and partial characterized. Identification strains conducted with 16S rRNA analyzes. These three strains (*Bacillus* sp. V-41, *Bacillus* sp. KH-13 and *Bacillus* sp. CU-48) were mutagenized by using Ethidium Bromide (EtBr) and four mutant variants obtained from each bacteria. α-amylase activity of V41-M4 mutant variant was higher than the rate of % 90.9 compared to the original strain V-41. Mutant variants of KH13-M3 and KH13-M4 had more α-amylase and ksilanase activity than original strain KH-13 by 15.74 % and 35.08% respectivily. Also α-Amylase activity of CU48-M42 mutant variant was higher than the rate of %101.32 compared to the original strain CU-48. By using Zimogram analyses, molecular weight of enzymes were determined as for α-amylase of V-41 strain it was 70 kDa, as for α-amylase and xylanase of KH-13 strain it was 66, and as for α-amylase of CU-48 strain it was 45 kDa. The specific activities of enzymes were investigated and it was determined that it was 1.27 µmol mg^{-1} dk^{-1} for V-41 strain, 5.35 and 2.58 µmol mg^{-1} dk^{-1} for α-amylase and xylanase of KH-13 respectivily, and lastly for α-amylase and CMCase of CU-48 are 4.4 and 1.30 µmol mg^{-1} dk^{-1}. Finally, the characteristics of enzymes and their activities acording to the time period was determined.

Keywords: *Bacillus*, Isolation, α-Amylase, CMCase, Xylanase, Mutation

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bana " Yem Katkısı Olarak Kullanılan Enzimleri Üreten Yeni Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve Enzim Üretimindeki Etkinliklerinin Saptanması" konulu doktora tezini veren yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren danışman hocalarım Sayın Prof.Dr. Zeynel CEBECİ ve Yrd.Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN' a sonsuz teşekkürler.

Doktora Tez İzleme Komitesi üyesi Sayın Prof.Dr. Numan ÖZCAN' a çalışmamın tüm aşamalarında yönlendirici aynı zamanda bu çalışmanın yürütülmesi için genetik mühendislik laboratuarın olanaklarını bana sağlayan ve olumlu katkılarından dolayı teşekkür ederim. Doktora tezi jüri üyelerinden Sayın Prof.Dr. Burhan ARIKAN' a ve Sayın Yrd.Doç.Dr. Makbule BAYLAN' a yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda bulundukları için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince bana yardımlarından dolayı Yüksek Lisans öğrencisi İslim POLAT ve Doktora öğrencisi Vahid DANESH' e teşekkür ederim.

Akademik hayatım süresince her türlü maddi ve manevi yardımlarını benden esirgemeyen annem, eşim, çocuklarım ve özellikle kardeşim Ramin KHODAYARİ' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER ..... ….IV
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
SİMGELER VE KISALTMALAR XIV
1. GİRİŞ 1
1.1. Mikrobiyal Kökenli Enzimler ve Kullanım Alanları 1
1.1.1. Yem Katkısı Olarak Kullanılan Enzimler 2
1.1.2. Çiftlik Hayvanlarında Kullanılan Enzimler 3
1.1.3. Yem Katkı Maddesi Olarak Amilaz Enziminin Kullanımı 4
1.1.4. Ksilanaz 4
1.1.5. Amilaz 5
1.1.6. Sellülazlar 6
1.1.6.1. Beta-(1,3-1,4) Glukanaz (Likenaz) 7
1.1.6.2. Beta (1,4) Glukanaz (CMCaz) 8
1.2. Ekstrem Mikroorganizmalar (Ekstremofiller) 8
1.3. Alkalifil Mikroorganizmalar 11
1.3.1. Aerobik Alkalifiller 11
1.3.2. Anaerobik Alkalifiller 11
1.4. Halofil Mikroorganizmalar 12
1.4.1. Halofilik Enzim Çözünürlüğü ve Stabiliteleri 14
1.4.2. Halofilik Mikroorganizmaların Tuz Toleransları ve Metabolizmaları . 16
1.4.3. Halofil Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Açıdan Önemi 17
1.5. Mutasyon 18
1.5.1. Mutasyonların Sınıflandırılması 19
1.5.2. Kimyasal Mutajenler 20
1.5.2.1. Nitrous asit (HNO2) 21

1.5.2.2. Ethyl methanesulphonate (EMS) 21
1.5.2.3. N-methyl-N'-nitrosoguanidin (NTG) 22
1.5.2.4. Baz analogları 23
1.5.2.5. Akridinler 24
1.5.2.6. Radyasyon 24
1.6. Amaç 25
1.7. Kapsam 25
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 27
2.1. Amilazla İlgili Yapılmış Çalışmalar 27
2.2. Selülaz (CMCaz)'la İlgili Yapılmış Çalışmalar 29
2.3. Ksilanazla İlgili Yapılmış Çalışmalar 31
2.4. Mutasyonla İlgili Yapılmış Çalışmalar 32
3. MATERYAL VE METOD 41
3.1. Materyal 41
3.1.1. Aletler 41
3.1.2. Bakteriler ve Besiyerleri 41
3.1.3. Kimyasal ve Sarf Malzemeler 42
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler 42
3.2. Metod 42
3.2.1. Örneklerden *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu 42
3.2.2. İzolatların Tür Analizi 43
3.2.3. Bakterilerde α-Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi 43
3.2.4. Bakterilerde CMCaz, Ksilanaz ve Likenaz Aktivitelerinin Belirlenmesi 44
3.2.5. Mutasyon İçin Bakterilerin Seçimi 44
3.2.6. Mutasyon Yöntemi 44
3.2.7. Kültür Stoklarının Hazırlanması 45
3.2.8. Antibiyogram Analizi 46
3.2.9. İzolatların ve Mutant Varyetelerinin SDS-PAGE ve Zymogram Analizleri 46
3.2.9.1. Hücredışı Proteinlerin TCA Muamelesi İle Elde Edilmesi 46

3.2.9.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (PAGE) Toplam Proteinlerin Karşılaştırılması 46
3.2.9.2.(1). SDS-PAGE Sisteminin Hazırlanması 47
3.2.9.2.(2). Elektroforez Aletinin Çalıştırılması 47
3.2.9.2.(3). SDS-PAGE Jelinin Boyanması 48
3.2.9.2.(4). İzolatların ve Mutant Varyetelerinin SDS-Nişasta-PAGE' de Karşılaştırılması 48
3.2.10. Enzimlerin Spesifik Aktiviteleri 48
3.2.11. İzolatlara ve Mutant varyetelere Ait Enzim Aktiviteleri..... 48
3.2.11.1. Bakterilerin Zamana Göre Enzim Aktiviteleri..... 48
3.2.11.2. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi 49
3.2.11.3. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Belirlenmesi 49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 51
4.1. *Bacillus* sp. V-41 izolatına Ait Bulgular..... 51
4.1.1. *Bacillus* Sp. V-41'e Ait Enzimatik Aktiviteler 51
4.1.2. *Bacillus* Sp. V-41 İzolatının Tür Analizi 52
4.1.3. *Bacillus* sp. V-41 Üzerine Yapılan Mutasyon Çalışmaları 53
4.1.4. *Bacillus* sp. V-41 ve Mutantlarının Antibiyogram Analizi..... 53
4.1.5. V-41 İle Mutantlarının SDS-PAGE Ve SDS-NİŞASTA-PAGE'de Analizleri..... 54
4.1.6. *Bacillus* Sp. V-41 İzolatı İle Bu İzolattan Elde Edilen Mutant Varyetelerin Spesifik Aktiviteleri 55
4.1.7. *Bacillus* sp. V-41 İzolatı İle Bu İzolattan Elde Edilen Mutant Varyetelerin Enzim Aktiviteleri Bakımından Karşılaştırılması..... 56
4.1.8. *Bacillus* sp. V-41 İzolatın ve V41-M4 Mutant Varyetesinin Zamana Göre Amilaz Aktiviteleri..... 57
4.1.9. *Bacıllus* sp. V-41 İzolatın ve V41-M4 Mutantına Ait α-Amilaz Enzimlerinin Optimum Sıcaklıkları 57

4.1.10. *Bacıllus* sp. V-41 İzolatın ve V41-M4 Mutant Varyetesine Ait α-Amilaz Enziminin Optimum pH Değerleri 58
4.2. *Bacillus* sp. KH-13 İzolatına Ait Bulgular 59
4.2.1. *Bacillus* Sp. KH-13'e Ait Enzimatik Aktiviteler 59
4.2.2. *Bacillus* sp. KH-13 İzolatının Tür Analizi 59
4.2.3. *Bacillus* sp. KH-13 Üzerine Yapılan Mutasyon Çalışmaları 61
4.2.4. *Bacillus* sp. KH-13 ve Mutantlarının Antibiyogram Analizi 61
4.2.5. KH-13 İle Mutantlarının SDS-PAGE Ve SDS-NİŞASTA-PAGE'de Analizleri 62
4.2.6. *Bacillus* sp. KH-13 İzolatı İle Bu İzolattan Elde Edilen Mutant Varyetelerin Spesifik Aktiviteleri 63
4.2.7. *Bacillus* sp. KH-13 İzolatı İle Bu İzolattan Elde Edilen Mutant Varyetelerin Enzim Aktiviteleri Bakımından Karşılaştırılması 64
4.2.8. *Bacillus* sp. KH-13 İzolatı ile KH13-M3 Mutant Varyetesinin Zamana Göre Amilaz ve Ksilanaz Aktiviteleri 65
4.2.9. *Bacıllus* sp. KH-13 İzolatı ile KH13-M3 Mutant Varyetesine Ait α-Amilaz ve Ksilanaz enzimlerinin Optimum Sıcaklıkları 66
4.2.10. *Bacıllus* sp. KH-13 ve KH13-M3 Mutant Bakterilerine Ait α-Amilaz ve Ksilanaz Enzimlerinin pH Optimumları 67
4.3. *Bacillus* sp CU-48 İzolatına Ait Bulgular 68
4.3.1. *Bacillus* Sp. CU-48'e Ait Enzimatik Aktiviteler 68
4.3.2. *Bacillus* sp. CU-48 Suşunun 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları 69
4.3.3. *Bacillus* sp. CU-48 Üzerine Yapılan Mutasyon Çalışmaları 70
4.3.4. *Bacillus* sp. CU-48 normal ve Mutantlarının Antibiyogram Analizi 71
4.3.5. CU-48 İle Mutantlarının SDS-PAGE Ve SDS-NİŞASTA-PAGE'de Analizleri 72
4.3.6. *Bacillus* sp. CU-48 İzolatı İle Bu İzolattan Elde Edilen Mutant Varyetelerin Spesifik Aktiviteleri 73
4.3.7. *Bacillus* sp. CU-48 İzolatı İle Bu İzolattan Elde Edilen Mutant Varyetelerin Enzim Aktiviteleri Bakımından Karşılaştırılması 74
4.3.8. *Bacillus* sp. CU-48 İzolatın ve CU48-M2 Mutant Varyetesinin

Zamana Göre Amilaz Aktiviteleri..... 75
4.3.9. *Bacıllus* sp. CU-48 İzolatın ve CU48-M2 Mutantına Ait α-amilaz Enzimlerinin Optimum Sıcaklıkları..... 76
4.3.10. *Bacıllus* sp. CU-48 İzolatın ve CU48-M2 Mutant Varyetesine Ait α-Amilaz Enziminin Optimum pH Değerleri..... 77
4.3.11. İzolatların BLAST Programı İle Karşılaştırmaları..... 77
4.4. Tartışma..... 78
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... 83
KAYNAKLAR..... 87
ÖZGEÇMİŞ..... 105
EKLER..... 106

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Yem katkı maddesi olarak kullanılan enzimler (Özen, 2007)..... ..3

Çizelge 1.2. Bazı ekstremozimler ve uygulama alanları (Demirjian ve ark., 2001) 10

Çizelge 1.3. Bazı halofillerin ürettiği ekstremofil enzimleri (Gomes ve Steiner, 2004) 15

Çizelge 4.1. *Bacillus* sp. V-41 izolatına ait bazı enzimlerin aktivite durumu 51

Çizelge 4.2. V-41 izolatının Uncultured bacterium clone HAV7D9G02CMKTO 16S ribosomal RNA gene, partial sequence ile16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları..... 52

Çizelge 4.3. *Bacillus* sp. V-41 ile mutant bakterilerin antibiyogram sonuçları..... 54

Çizelge 4.4. *Bacillus* sp. KH-13 izolatına ait enzim aktivite durumu 59

Çizelge 4.5. Çizelge 4.5. KH-13 izolatının *Bacillus* sp. M26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence ile16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları 60

Çizelge 4.6. *Bacillus* sp. KH-13: Normal ve mutant suşlarının antibiyogram Testi..... 62

Çizelge 4.7. *Bacillus* sp. CU-48 izolatına ait enzim aktivite durumları 68

Çizelge 4.8. CU-48 izolatının *Bacillus thermolactis* partial 16S rRNA gene, strain (R-6486) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları..... 70

Çizelge 4.9. *Bacillus* sp. CU-48 ve mutant varyetelerinin antibiyogram Testi sonuçları 71

Çizelge 4.10. V-41, KH-13 ve CU-48 izolatların 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları 78

Çizelge 5.1. Normal bakteriler ile mutant varyetelerinin kısmi karakterizasyonları 84

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Ksilanaz enziminin molekül yapısı 5
Şekil 1.2. Amilaz enziminin molekül yapısı 6
Şekil 1.3. β-(1,3-1,4) Glukanazın molekül yapısı 7
Şekil 1.4. Ekstremofiller ve yaşam alanları 9
Şekil 1.5. İyonların ve diğer moleküllerin halofilik bakterilerde membran boyunca geçiş hareketleri (Danson ve Hough, 1998). 16
Şekil 1.6. Nitrö asit mutagenesizinin mekanizması 21
Şekil 1.7. Ethyl methanesulphonate'ın (EMS) kimyasal yapısı.....22
Şekil 1.8. 1-methyl-2-nitro-1-nitrosoguanidinenin molekül yapısı 23
Şekil 1.9. 5-BrU tautomerik formları. 23
Şekil 1.10. 2-amino purinin kimyasal yapısı. 24
Şekil 1.11. EtBrnin kimyasal yapısı. 24
Şekil 3.1. LB (Luria-Bertani) besi yerlerinde bakteri kültürlerinin üretilmesi 43
Şekil 3.2. İzolatlara ve mutantlarına ait hücre dışı proteinlerin elektroforez işlemine tabi tutulması 47
Şekil 4.1. *Bacillus* sp. V-41 izolatının LB-Nişasta-Agarda iyot boyaması sonucu görüntüsü (α-amilaz+) 51
Şekil 4.2. *Bacillus* sp. V-41 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin LB- Nişasta-Agarda iyot boyaması ile karşılaştırılması. 53
Şekil 4.3. *Bacillus* sp. V-41 ile mutantlarına ait antibiyogram test plaklarının görüntüsü a) V-41, b) V41-M1, c) V41-M2, d) V41-M3 e) V41-M4. 54
Şekil 4.4. *Bacillus* sp. V-41 izolatı ve mutant varyetelerine ait toplam proteinlerinin SDS-PAGE'de (A), α-Amilaz aktivitelerinin ise SDS-Nişasta-PAGE'de (B) karşılaştırılması. (M: marker, 1: V-41, 2: V41-M1, 3: V41-M2, 4: V41-M3, 5: V41-M4)... 55
Şekil 4.5. *Bacillus* sp. V-41 izolatı ile elde edilen mutant varyetelerin α-Amilaz üretimi bakımından spesifik aktivitelerinin karşılaştırılması......56
Şekil 4.6. *Bacillus* sp. V-41 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerinin α-Amilaz üretimi bakımından karşılaştırılması.. 56

Şekil 4.7. *Bacillus* sp. V-41 ile V41-M4 mutantının zamana göre amilaz aktivite grafiği.. 57
Şekil 4.8 *Bacillus* sp. V-41 ile V41-M4'üne ait α-Amilaz enzimlerinin sıcaklık optimum aktivite grafiği..... 58
Şekil 4.9. *Bacillus* sp. V-41 izolatın ve V41-M4 mutantın farklı pH' larda α-Amilaz üretimi.. 58
Şekil 4.10. *Bacillus* sp. KH-13 izolatının LB-Nişasta-Agar (A) ve LB-Ksilan-agarda aktivite zonları. 59
Şekil 4.11. *Bacillus* sp. KH-13 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin LB-Nişasta-Agar (A) ve LB-Ksilan-Agarda (B) karşılaştırılmaları.....61
Şekil 4.12. *Bacillus* sp. KH-13 ile mutantlarına ait antibiyogram test plaklarının görüntüsü: a) KH-13, b) KH13-M1, c) KH13-M2, d) KH13-M3, e) KH13-M4... 62
Şekil 4.13. *Bacillus* sp. KH-13 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin toplam protein bakımından SDS-PAGE'de (A), α-Amilaz aktivite bantı bakımından SDS-Nişasta-PAGE'de (B) karşılaştırılması. (M: marker, 1: KH-13, 2: KH13-M1, 3: KH13-M2, 4: KH13-M3, 5: KH13-M4).. 63
Şekil 4.14. *Bacillus* sp. KH-13 izolatı ile elde edilen mutant varyetelerin α-Amilaz ve ksilanaz enzimi bakımından spesfik aktiviteleri.....64
Şekil 4.15. *Bacillus* sp. KH-13 izolatı ile elde edilen mutant varyetelerin α-amilaz ve ksilanaz enzimlerini üretimi bakımından karşılaştırılması.. 65
Şekil 4.16. *Bacillus* sp. KH-13 izolatı ile KH13-M3 mutant varyetesinin zamana göre α-Amilaz üretim grafiği..... 65
Şekil 4.17. *Bacillus* sp. KH-13 izoltı ile KH13-M4 mutant varyetesinin zamana göre ksilanaz üretim grafiği.. 66
Şekil 4.18. *Bacillus* sp. KH-13 ile KH13-M3 mutantına ait α-amilaz enzimlerinin optimum sıcaklık grafiği. 66
Şekil 4.19. *Bacillus* sp. KH-13 ile KH13-M4 mutantına ait ksilanaz enzimlerinin optimum sıcaklık grafiği. 67

Şekil 4.20. *Bacillus* sp. KH-13 ile KH13-M3 mutantına ait α-amilaz enzimlerinin pH grafikleri. 67
Şekil 4.21. *Bacillus* sp. KH-13 ile KH13-M4 mutantına ait ksilanaz enzimlerinin pH grafikleri. 68
Şekil 4.22. *Bacillus* sp. CU-48 izolatının LB-Nişasta-Agar (a) ve LB-CMC-agarda (b) aktivite zonları.. 69
Şekil 4.23. *Bacillus* sp. CU-48 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin LB-Nişasta-Agar (A) ve LB-CMC-Agarda (B) karşılaştırılmaları.....71
Şekil 4.24. *Bacillus* sp. CU-48 ile mutantlarına ait antibiyogram test plaklarının görüntüsü: a) CU-48, b) CU48-M1, c) CU48-M2, d) CU48-M3, e) CU48-M4. 72
Şekil 4.25. *Bacillus* sp. CU-48 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin toplam protein bakımından SDS-PAGE'de (a), α-Amilaz aktivite bantı bakımından SDS-Nişasta-PAGE'de (b) karşılaştırılması. (M: marker, 1: CU-48, 2: CU48-M1, 3: CU48-M2, 4: CU48-M3, 5: CU48-M4).. 73
Şekil 4.26. *Bacillus* sp. CU-48 izolatı ile elde edilen mutant varyetelerin α-Amilaz ve CMCaz enzimi bakımından spesfik aktiviteleri.. 74
Şekil 4.27. *Bacillus* sp. CU-48 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerinin α-Amilaz üretimi bakımından spesifik aktivitelerinin relatif olarak karşılaştırılması.....74
Şekil 4.28. CU-48 ile bu suştan elde edilen mutant suşları CMCaz enzim üretimi bakımından karşılaştırılması... 75
Şekil 4.29. *Bacillus* sp. CU-48 ile CU48-M2 mutantının zamana göre Amilaz aktivite grafiği... 76
Şekil 4.30. *Bacillus* sp. CU-48 ile CU48-M2'ye ait α-Amilaz enzimlerinin farklı sıcaklıklarda optimum aktivite grafiği.. 76
Şekil 4.31. *Bacillus* sp. CU-48 izolatın CU48-M2 mutantına ait α-Amilaz enzimlerinin pH grafikleri.. 77

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMPS	**:** Amonyum persülfat
CMC	**:** Karboksimetilselüloz
DNS	**:** Dinitrosalisilik asit
CMCaz	**:** Karboksimetilselülaz
EDTA	**:** Etilendiaminotetraasetik asit
L	**:** Litre
LB	**:** Luria Bertani
M	**:** Molar
ml	**:** Mililitre
mM	**:** Milimolar
mg	**:** Miligram
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
µg	**:** Mikrogram
µL	**:** Mikrolitre
SDS	**:** Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	**:** Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
α	**:** Alfa
β	**:** Beta
rpm	**:** dakikada devir sayısı
Tris	**:** 2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
TEMED	**:** N,N,N,N-Tetrametil etilendiamin
TCA	**:** Trikloro asetik asit
ME	: Metabolik enerji

1. GİRİŞ

Enzimler hücrelerdeki metabolik faaliyetlerin tümünü yöneten özel katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamalarda, enzimatik işlemlerin, geleneksel işlemlere oranla daha az miktarda atık oluşturarak daha az çevre kirliliğine yol açması, uygun ve ekonomik şartlarda gerçekleştirilebilmesi enzim kullanımını daha cazip hale getirmektedir. Mikroorganizma kökenli enzimlerin biyoteknolojik işlemlerle daha ekonomik biçimde üretimi ve suda çözünmeyen matrikslerle immobilize edilerek daha uzun süre kullanılabilmesi, mikrobiyal enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanılmasındaki artış nedenleridir (Gümüşel, 2002).

Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimler genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bununla birlikte çok az bir kısmı da bitkisel ve hayvansal kaynaklı olarak sağlanmaktadır. Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin nedenleri; yan ürün oluşturmalarının az olması, aktivitelerinin yüksek olması, daha ekonomik olması, yüksek stabiliteye sahip olması, yüksek oranlarda ve saflıkta üretilebilmeleridir (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999).

Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında %25 alkalin proteaz, %21 diğer proteazlar, %18 amilaz, %10 rennin, %3 tripsin, %3 lipaz ve %10 diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi), %10 kadar ise analitik ve farmasötik enzimlerin olduğu şeklinde bir dağılım belirlenmiştir (Rao ve ark., 1998).

1.1. Mikrobiyal Kökenli Enzimler ve Kullanım Alanları

Endüstride kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kökenli olmakla beraber, ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. *Bacillus* sp. suşları proteolitik enzimler ve karbohidrazların önemli bir kaynağı olarak bilinmektedir. Özellikle proteazlar deterjan sanayisi gibi geniş uygulama alanlarında kullanıldıkları için önemli endüstriyel enzimlerdir (Austrup, 1981). Biyoteknolojik

açıdan önemli diğer bir enzim olan α-amilaz ise *Bacillus* sp. grubunda oldukça yaygın bir şekilde bulunur.

1.1.1. Yem Katkısı Olarak Kullanılan Enzimler

Hayvanlarda yemden yararlanma yeteneğini artırmak amacıyla uygulanan yöntemlerden birisi de yemlerin sindirilme derecelerinin artırılmasıdır. Bu amaçla enzimler son yıllarda, çeşitli ülkelerde yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Ceylan ve ark.,1999; Demirel ve Gürbüz, 1999).

Enzimler sindirim sisteminde nişasta, protein ve yağları parçalayarak sindirimi kolaylaştırırlar. Yem katkı maddesi olarak kullanılan enzimler mantar ve bakteri kökenlidirler (Demirel ve Gürbüz, 1999; Sevgili ve ark., 1999). Bunlardan proteaz, glukanaz, selülaz, pektinaz, amilaz, fitaz ve lipaz gibi çeşitli enzimler tek başına veya kombine olarak karma yemlere katılmak suretiyle yem sanayinde kullanılmaktadır. Enzim kullanımı ile yemlerin sindirilme dereceleri, metabolik enerji değerleri artırılmakta ve hayvanların yemden yararlanma oranlarında artış sağlanmaktadır (Ceylan ve ark., 1999; Coşkun ve ark., 2000 ; Sevgili ve ark., 1999). yem katkı maddesi olarak kullanılan enzimler, substratları ve etkileri Çizelge 1.1.' de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Yem katkı maddesi olarak kullanılan enzimler (Özen, 2007)

Enzimler	Substrat	Etkisi
β-Glukanaz (CMCaz, Likenaz)	Arpa ve yulaftaki β-glukan	Bağırsak viskozitesini azaltır; altlık kalitesini ve yemden yararlanmayı iyileştirir; yumurta tavuklarında yumurta kirliliğini azaltır.
Ksilanaz	Buğday ve yulaftaki pentozanlar	Bağırsak viskozitesini azaltır; yemden yararlanmayı arttırır; altlık kalitesini iyileştirir.
Pektinaz	Yemlerdeki pektin	Bağırsak viskozitesini azaltır.
Selülaz	Yemlerdeki selüloz	Selülozu parçalayarak diğer besin maddelerinin ortaya çıkmasını sağlar.
Proteaz	Bitkisel proteinler	Protein sindirilebilirliğini artırır.
α -Amilaz	Nişasta	Endojen enzimleri destekler; nişastadan yararlanmayı artırır.
α-Galaktosidaz	Soya oligosakkaritleri	Enerjiden yararlanmayı arttırır.
Fitaz	Fitik asit	Bitkisel fosfattan yararlanmayı arttırır

1.1.2. Çiftlik Hayvanlarında Kullanılan Enzimler

Çiftlik hayvanlarda kullanılan enzimler kaynakları ile beraber aşağıda verilmiştir (Mcallister ve ark., 2001).

Bakteriler	**mantarlar**	**maya**
Bacillus subtilis	*Trichoderma longibrachiatum*	*Saccharomyces cerevisiae*
Lactobacillus acidophilus	*Aspergillus oryzae*	
Lactobacillus plantarum	*Trichoderma reesei*	
Streptococcus faecium		

1.1.3. Yem Katkı Maddesi Olarak Amilaz Enziminin Kullanımı

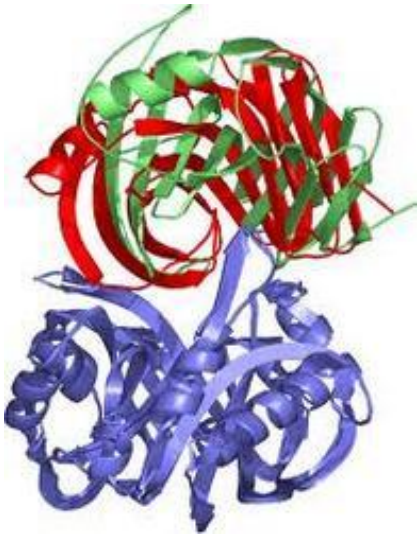
Yüksek düzeyde ham selüloz (HS) içeren kalitesiz kaba yemlerde fibrolitik enzimlerin, yüksek oranda nişasta içeren kuzu-buzağı başlangıç yemlerinde amilazların kullanımının yemlerdeki sindirimini, yemlerdeki mevcut besin maddelerinin emilimini ve ME değerlerini artırdığı ifade edilmektedir (Karademir ve Karademir, 2003). Sütten kesimdeki domuzlarda pankreasta amilaz ve proteaz üretiminin düştüğü ve domuzların sütten kesim sonrası yemlerine bu enzimlerin ilavesinin faydalı olduğu bildirmiştir (Godfrey ve West, 1996).

Ruminantlarda nişastanın rumen yerine ince barsakta hidrolizi asidoz riskini azaltmaktadır. Fakat hidrolize olmamış nişastanın kolon (kalın bağırsak) ve sekuma (kör bağırsak) ulaşması durumunda hayvan nişastadan yeterince faydalanamadığı gibi fermentatif asidoza da sebep olabilmektedir (Channon ve Rowe, 2004). Kümes hayvanlarında ise pankreatik amilaz ve proteaz üretiminin kuluçkadan çıkıştan sonra hızla gelişmesine karşılık büyümenin ilk 10 gününde bu enzimlerin eksikliği gözlenebilmektedir (Nir ve ark., 1993). Canoğulları (1999) mısır ve soya fasulyesi küspesine dayalı etlik piliç karma yemlerinde %0.1 düzeyinde α-amilaz enzimi kullanımının, kuru madde tüketimi, canlı ağırlık kazancı, but ve göğüsteki deri ve yağ oranları bakımından daha kaliteli karkas elde edilebileceğini bildirmiştir. Yine benzer bir çalışmada amilaz ve asit proteaz enzimlerince takviye edilmiş mısır-soya yemlemesi ile civcivlerin canlı ağırlık kazancının %20, yemden yararlanma oranının ise %5 düzeyinde arttığı bildirilmiştir (Kobayashi ve ark., 2002). α-Amilaz enzimi de içeren ticari enzim karışımları ile yapılan bir çalışmada ise etçi tavuklarda canlı ağırlık ve yemden yararlanmada bir artış meydana geldiği bildirilmiştir (Alam ve ark., 2003).

1.1.4. Ksilanaz

Mikroorganizmaların canlı bitki dokusuna geçişini engellemek için bitki hücre duvarları bir bariyer meydana getirmektedir (Chen ve ark., 1996). Dünyada yakıt ihtiyacını karşılayan ve yeterince kısa bir döngüye sahip olan alternatif doğal

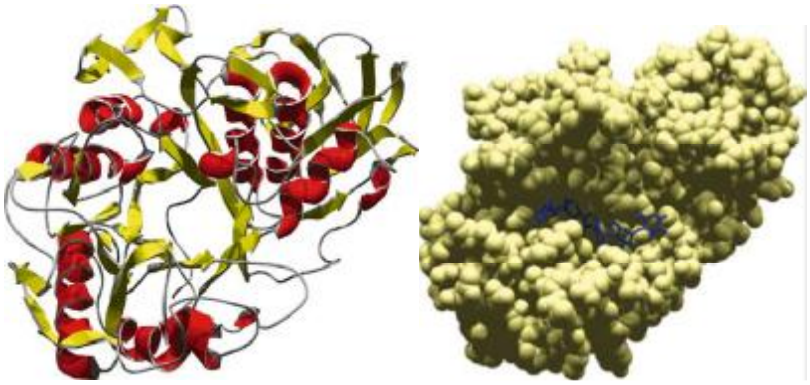
kaynaklar biyokütle olarak bilinmektedir. Ksilan, yüksek bitkilerin hücre duvarının hemiselülozik bölgesinin esas bileşenidir ve yüksek potansiyelde kullanılan, son ürünlere parçalanabilen ikinci en bol kaynaktır (Christov ve ark., 1996, Gessesse, 1998). Ksilanazlar (Şekil 1.1.) gıda endüstrisinde de geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ksilanazlar ekmek ve hamur kalitesinde olumlu bir etkiye sahiptir. Buğday ununda bulunan ksilanaz için substrat olan arabinoksilan üzerinde özellikle son on yıldır yoğun çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca ksilanaz, şıra ve meyve suyunun arıtılmasındada kullanılmaktadır (Keskin, 1982).



Şekil 1.1. Ksilanaz enziminin molekül yapısı

1.1.5. Amilaz

Amilazlar, nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize ederek glikoz, maltoz, maltotrioz ve α-limit dekstrinlerin oluşmasını sağlayan ekstraselüler enzimlerdir (Şekil 1.3.).



Şekil 1.2. Amilaz enziminin molekül yapısı

Fungal α-amilazların sıcaklıktaki stabilitesinin bakteriyel α-amilazlardan daha düşük sebebiyle enzim kaynağı olarak daha çok bakteriyel α-amilazlar, özelliklede *Bacillus* amilazları araştırma odağı olmuştur (Wiseman, 1987). Termostabil α-amilazlar, tekstil ve kağıt endüstrisinde, nişastanın sıvılaştırılmasında, glikoz ve fruktoz şurupları ile tutkal üretiminde, alkol fermentasyonunda ekmek kalitesinin iyileştirmesinde kullanılmaktadır (Bailey ve Ollis, 1977; Bajpai ve Bajpai, 1987). *Bacillus* ve *Aspergillus* tarafından üretilen, bira, damıtma, fırıncılık ve tekstil endüstrisinde kullanılan ve ayrıca arpa ve buğday maltında da bulunabilen enzimler amilaz ve endo β-glukanazlardır (Demain ve Solomon, 1981).

1.1.6. Sellülazlar

Selülazlar, proteazlardan ve amilazlardan sonra endüstriyel olarak üçüncü önemli biyoteknolojik enzimlerdir. Selüloz hidrolizini gerçekleştiren enzimler genellikle büyük oranlarda mantar ve bakterilerden elde edilmektedir. Bu enzimler çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda geniş çapta kullanılmaktadır. Selülotik enzimlerin alkol üretiminde de kullanılmasının nedeni, sıvı kazancını artırmak ve iyi bir renk elde etmektir. Deterjanlarda ise renklerin canlanmasına, yumuşamasına ve partikül halindeki toprağın uzaklaşmasına selülaz enziminin neden olduğu bilinmektedir ve ayrıca tekstil sektöründe kot pantolonların biyolojik olarak taşlanmasında da selülaz enzimi kullanılmaktadır (Niehaus ve ark., 1999). Özellikle endo-ksilanlarla beraber fırıncılık ürünlerinin kalitesinin artırılmasında yine selülazlar da kullanılmaktadır. Ayrıca selülazlar yem sektöründe selülozik

biyokütlenin ve yemlerin besin değerini ve sindirilebilirliğini artırmak, zirai ve endüstriyel atıkların enzimatik sakkarifikasyonu amacıyla da kullanılmaktadır (Niehaus ve ark., 1999).

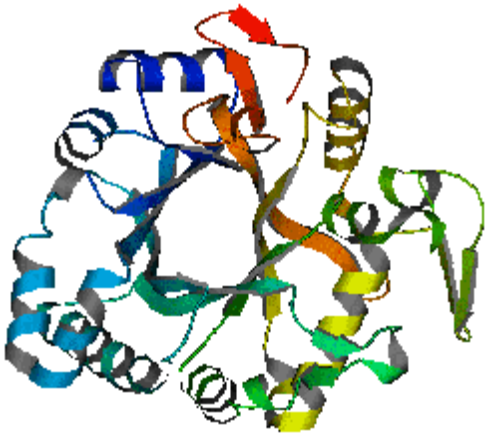
Mikroorganizmaların *Bacillus* cinsine ait üyelerinde çeşitli ekstraselüler selülaz enzimleri endüstriyel açıdan büyük öneme sahiptir (Mawadza ve ark., 2000).

1.1.6.1. Beta-(1,3-1,4) Glukanaz (Likenaz)

β-(1,3-1,4)-glukanlar (Şekil 1.4.), *Poaceae* familyası bitkilerinin hücre duvarı polisakkarit bileşikleri olup *Graminae* familyasının özellikle ticari öneme sahip arpa, sorgum, pirinç, buğday ve çavdar gibi tahılların endosperm hücre duvarında bulunur (Stone ve Clarke, 1992).

Bitkilerin yanısıra bakteri, fungus gibi birçok mikroorganizma da önemli düzeyde β(1,3-1,4)-glukanaz kaynağıdır. Ancak bitki ve mikrobiyal kaynaklı enzimler birbirlerinden aminoasit sıraları ve üç boyutlu yapıları gibi birtakım özellikler bakımından farklılıklar gösterirler.

Bakteriyel β(1,3-1,4)-glukanazlar bira sanayinde de önemli bir yere sahiptir. Malt yapımı sırasında endojen (içsel) β(1,3-1,4)-glukanazlar sıcaklıkla inaktif olurlar ve fazla miktardaki yüksek moleküler ağırlığa sahip β-glukanlar bira yapımının son aşamasında jelatinimsi görünümün yanı sıra düşük filtrasyon oranı ve ekstrakt veriminin düşmesi gibi önemli sorunlara neden olabilmektedirler.



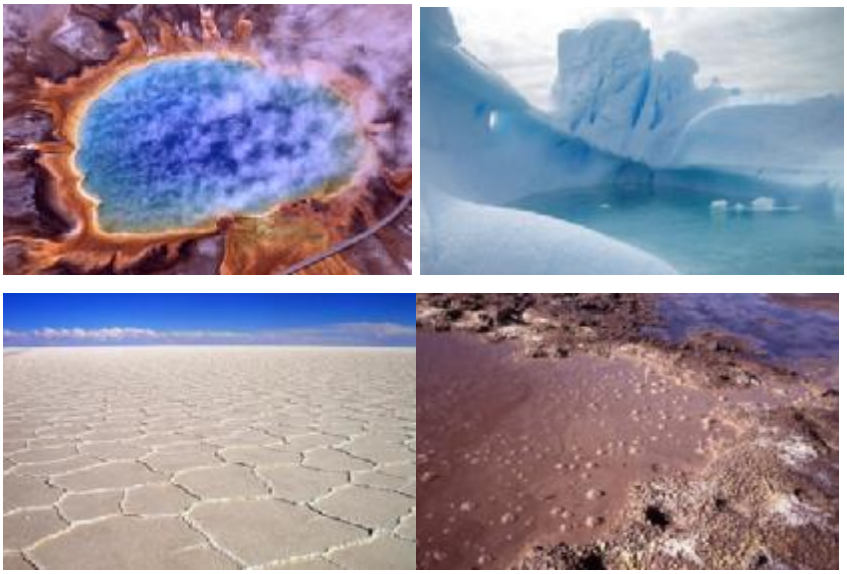
Şekil 1.3. β-(1,3-1,4) Glukanazın molekül yapısı

1.1.6.2. Beta (1,4) Glukanaz (CMCaz)

Karboksimetil selüloz (CMC), omurgayı oluşturan glikoz birimlerinin hidroksil gruplarının bazılarına karboksimetil gruplarının bağlanması ile oluşan bir selüloz türevidir. Kloroasetik asit ile selülozun alkali olarak katalizlenen reaksiyonu ile sentezlenir. Gıda endüstrisinde ve kozmetik sanayinde kullanılır. Karboksimetilselülozun ve onun sodyum tuzunun (Na-CMC) çok fazla kullanım alanına sahip olması diğer ticari selüloz eterlere göre daha fazla üretilmesine yol açmıştır. Karboksimetilselüloz (CMC) üretimi alkali selüloz ile monokloroasetik asit veya Na-monokloroasetatın reaksiyonu sonucu üretilmektedir (Fengel ve Wegener, 1989). Beta (1,4) glukanaz özellikle hayvancılıkta ve yem endüstrisinde ilgi çeken bir enzim olmaktadır. Silajda selüloz moleküllerinin yumuşatılması, kısmi parçalanması ve laktik asitin dokulara hızlı nüfuzunun sağlanmasında kullanılır (Rossi ve ark., 2001).

1.2. Ekstrem Mikroorganizmalar (Ekstremofiller)

Ekstremofiller, dünya yüzeyinin 3 km altı, nükleer reaktörler, hidrotermal ventler, asitli kaynaklar, tuz kristalleri, yüksek ağır metal içeren bölgeler, kutup buzları ve gölleri, basınçlı ortamlar ve anaerobik koşullar gibi ekstrem çevre şartlarında gelişebilen mikroorganizma gruplarına verilen isimdir (Şekil 1.7.). Bu aşırı şartlar; sıcaklık, radyasyon, basınç gibi fiziksel şekilde olabildiği gibi; tuzluluk, kuruluk, pH, oksijen durumu, redoks potansiyeli, metaller ve gazlar gibi jeokimyasal biçimlerde de olabilmektedir.



Şekil 1.4. Ekstremofiller ve yaşam alanları

Ekstrem şartlara dayanıklı olan enzimlerin kullanılmak istenmesinin nedeni endüstriyel açıdan önemli olan birçok kimyasal işlemlerin yüksek sıcaklık ve basınç gibi sert koşullar altında gerçekleşmesidir. Günümüzde endüstride yaygın olarak kullanılan mezofilik mikroorganizmaların avantajlarının fazla olmasına rağmen kimyasal işlemlerdeki ekstrem pH, sıcaklık ve iyon konsantrasyonu gibi uygulamalarda kullanımları sınırlı kalmaktadır. Buna karşılık ekstrem mikroorganizmalardan elde edilen enzimler (ekstremozimler) bahsedilen sert koşullara dayanıklıdır. Bu nedenle ekstremozimler son 20 yılda biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu enzimler ayrıca protein mühendisliğinde termoaktivite ve termostabilitenin tam olarak anlaşılabilmesi için model enzimler olarak kullanılmaktadır (Kumar ve Nussinov, 2001; Sterner ve Lieble, 2001). Bazı ekstremozimler ve uygulama alanları Çizelge 1.2.' de verilmiştir (Demirjian ve ark., 2001).

Çizelge 1.2. Bazı ekstremozimler ve uygulama alanları (Demirjian ve ark., 2001)

Ekstremofil	**Enzim**	**Endüstriyel uygulamalar**
Termofil (55- 113 °C)	Amilazlar Ksilanazlar Proteazlar DNA polimerazlar	Tatlandırıcılar için glikoz ve fruktoz Kağıt beyazlatma Fırıncılık, bira, deterjan Genetik mühendisliği
Psikrofil (-2- 20 °C)	Proteazlar Dehidrogenazlar Amilazlar	Peynir olgunlaştırılması, süt üretimi Biyosensörler Deterjanlarda polimer degradasyonu
Asidofil (pH< 3)	Sülfür oksidaz	Kömür desülfürizasyonu
Alkafil (pH> 8)	Selülazlar	Deterjanlarda polimer degradasyonu
Halofil (2– 5 M NaCl)	-	Poli (α-glutamik asit)(PGA) üretimi Poli (β-hidroksi butirik asit)(PHB) üretimi
Barofil (Yüksek basınç)	Tüm mikroorganizma	Jellerin ve nişasta granüllerinin oluşturulması
Metalofil (Yüksek metal konsantrasyonu)	Tüm mikroorganizma	Maden cevheri elde edilmesi, biyomineralizasyon

Günümüze kadar, ekstremofil ve hipertermofil mikroorganizmalardan polisakkarit parçalayan selülaz, amilaz, pullulanaz, lipaz, esteraz, fitaz gibi enzimlerin karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve endüstriyel işlemler için yeni imkanlar sağlanmıştır (Haki ve Rakshit, 2003).

1.3. Alkalifil Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar içerisinde alkalifiller; Alkalifiller ve Haloalkalifiller olarak 2 ana fizyolojik grup başlığı altında toplanırlar. Alkalifillerin gelişebilmeleri için ortam pH' larının 9.0 veya daha yukarıda olması gerekmektedir. Genel olarak pH 10.0 civarında optimal büyüme gösterirler. Bununla birlikte haloalkalifillerin büyüme pH' ları da 9.0 ve üzerindedir. Ayrıca haloalkalifiller yüksek tuz konsantrasyonlarında da üreme göstermektedirler (%33 w/v NaCl ve daha üzeri). Alkalifiller nötr topraklardan, dışkılardan ve hatta asidik topraklardan bile izole edilmişlerdir. Haloalkalifil izolasyonları başlıca Güney Afrika'da ki Rift Valley Gölü ile Birleşik Devletlerın doğusunda yer alan soda gölleri gibi ekstrem bazik ve tuzlu çevrelerden yapılmıştır (Horikoshi, 1999).

1.3.1. Aerobik Alkalifiller

Doğada ekstrem çevrelerde alkalifilik mikroorganizmalar, nötrofilik mikroorganizmalar ile bir arada bulunurlar. Alkalifil mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılan besiyerlerinin bazik (alkali) olması gerekir. Sodyum karbonat, pH' nin 10 civarlarına ayarlanması için kullanılır. Çünkü alkalifiller çok düsük miktarlarda da olsa sodyum iyonlarına ihtiyaç duyarlar (Horikoshi, 1999).

1.3.2. Anaerobik Alkalifiller

Anaerobik alkalifiller hakkında ilk bilgiler Niiumura ve ark. (1987) tarafından verilmiştir (Horikoshi, 1999' dan). Bununla beraber taksonomik ayrıntıları hakkında fazla bilgilere değinilmemiştir. Ardından bazı spor forma sahip anaerobik alkalifiller klasik yöntemlerle izole edilmişlerdir ve birkaç farklı uygulamalar denenmiştir. Podkovyrov ve Zeikus (1992), *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E' den siklomaltodekstrin glukanotransferaz izolasyonu ve saflaştırılmasını gerçekleştirmişler (Horikoshi, 1999' den). Lee ve ark. (1994) ile Engle ve ark. (1995) birçok termofilik anaerobik alkalifillerin izolasyonunu ve karakterizasyonunu

yapmışlardır (Horikoshi, 1999' dan). Yellowstone Ulusal Parkından elde edilen toprak ve su örneklerinden benzer özelliklerdeki dokuz tane kısmen alkalitolerant termofilik bakterilerin izolasyonu yapılmıştır. Cook ve ark. (1996)'nın tanımladığına göre yeni bir alkali-termofil tür olan *Clostridium paradoxum* hücre içi pH homeostasisini koruyabilmekte ve besiyerinde pH 7.6 ile 9.8 aralığında rahatlıkla üreyebilmektedir (Horikoshi, 1999' dan).

1.4. Halofil Mikroorganizmalar

Tuz konsantrasyonları deniz suyundan fazla olan sular hipersalin sulardır ve %3,5 w/v civarındadır. Hipersalin çevrelerin iki çeşit olarak bilinir. Bunlardan thalassohaline sular deniz türevlidir ve deniz suyuna benzer bir kompozisyona sahiptir. Solar tuzlalar ise deniz tuzu üretimi için deniz suyunun buharlaştırıldığı bölgelerdir. Bununla birlikte işlem esnasında çöken minerallerden dolayı böyle tuzlu suların son kompozisyonları deniz suyu kompozisyonundan farklıdır (Horikoshi ve Grant, 1998).

Günümüze kadar yapılan araştırmalarda tuzlu topraklar, tuz göllerine göre daha az çalışılmıştır. Bu tür topraklar hipersalin sulara göre daha az stabil olan alanlardır. Çünkü özellikle yağmur suyundan dolayı tuz oranları azalabilmektedir. Mikroorganizmaların daha az koloni oluşturduğu bilinen diğer bazı tuzlu ortamlar ise tuz çıkışının olduğu hayvan ve bitki yüzeyleridir. Hepsi olmasa da birçok hipersalin biyotop mikroorganizma populasyonunu barındırmaktadır. Böyle habitatlarda büyüme amacıyla ne tür substratların kullanıldığı pek belirlenmiş değildir. Hipersalin sular genelde önemli oranda (bazı durumlarda ise 1 g/l 'den fazla) çözünmüş organik karbon içerir. Tipik geniş yüzey/hacim oranına rağmen hipersalin sular çok az çözünmüş oksijen içerir ve hatta anaerobik olabilir. Deniz suyundaki oksijen çözünürlüğü 25 °C' de 7 mg/l civarındadır ve tuz çökeltisinde bu oran 2 mg/l' ye düşebilir (Horikoshi ve Grant, 1998).

Denizsel tuzlalarda aerobik heterotroflarla yapılan araştırmalarda, bakteriyel halofillerin 2 M NaCl' ye kadar baskın bulunduğunu ve bu konsantrasyonların üzerinde ise tamamen halobakterilerin baskın olduğunu göstermiştir (Rodriguez-

Valera ve ark., 1981). Yapılan farklı çalışmalarda tuzlu topraklardan hem bakteri hem de arkealerın izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Horikoshi ve Grant, 1998). Aerobik gram negatif heterotrofik bakteriler tuzlu sularda baskındır. Solar tuzlalarda gram pozitif aerobik heterotroflar, gram negatifler kadar yaygın değildir. Fakat *Marinococcus, Sporosarcina, Salinicoccus* ve *Bacillus* cinsinin benzer türleri tuzlu topraklardan ve tuzlalardan elde edilmiştir. Filogenetik analizler *Sporosarcina halophila*'nın *Sporosarcina ureae*'dan farklı olduğunu ve *Bacillus subtilis* grubuna yakın olduğunu göstermiştir. *Marinococcus halophilus, Bacillus alcalophilus*'a daha yakın olan farklı bir cinstir. Gram pozitif kok taksonomisi yeniden incelenmiş ve halen *Micrococcus* spp. olarak sınıflandırılan bazı bakterilerin *Salinicoccus* cinsine transfer edilmesi gerekli olduğunu belirtmiştir (Horikoshi ve Grant, 1998).

Horikoshi ve Grant (1998)'a göre, ekstremofilik mikroorganizmaların yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan üyeleri olan halofiller Archaea, Bacteria ve Eucarya olarak üç alanda da yer almaktadır.

Kushner'e (1978) göre ise,

- Halofil olmayanlar (non-halophiles) (0-1 M),
- Hafif halofiller (slight halophiles) (0,2-2,0 M),
- Ilımlı halofiller (moderately halophiles) (0,4-3,5 M),
- Ekstreme yakın halofiller (extreme close halophiles) (1,4-4,0 M),
- Ektsrem halofiller (extreme halophiles) (2,0-5,2 M),
- Halotolerantlar (halotolerant halophiles) (0-1 M) ve
- Değişken halofiller (variable halophiles) (0-3 M)

olarak sınıflandırılmışlardır. Halofilik mikroorganizmalar genel olarak tuzla, hipersalin göl gibi bölgelerde yaşam alanları bulurlar. Bu bölgelerde ökaryotlardan *Dunaliella* (% 10 w/v), *Artemia salina*, *Ephydra* gibi organizmalar da yer alır. Bakteriler içerisinde ise *Salinibacter ruber* (% 20-30 w/v) en ekstrem halofilik bakteri olma özelliğine sahiptir ve *Halobacterium, Haloferax, Haloarcula* gibi cinsler ise Arkea domaininde yer alır ve bunlar tuzun çökme noktasına yakın yoğunluklarda yaşayabilirler (Kushner, 1978).

Biyolojik tuza dayanıklılığın model organizmaları ekstrem halofil mikroorganizmalardır. Ayrıca değişik sıcaklıklarda ve tuz konsantrasyonlarında optimum aktivite gösteren amilaz, esteraz, pullulanaz, selülaz, ksilanaz, proteaz, lipaz ve DNAaz gibi birçok hidrolitik enzimlerin kaynakları olabilirler. Halofil arkeaların ekstremozimleri tuza son derece dayanıklı olmalarının yanı sıra uzun süreli yüksek sıcaklıklara karşı da dayanıklılık gösterebilirler. Bu özellikleri nedeni ile halofiller birçok uygulama için oldukça ilgi çekici hale gelmektedir. Bununla beraber halofil arkealara ait ticari değere sahip ekstremozim örnekleri vardır. *Halococcus* genusuna ait bir türden elde edilen restriksiyon enzimine ait üretim patenti mevcuttur (Obayashi ve ark., 1988). Düşük tuz yoğunluklarında aktivitesini kaybeden pek çok haloarkeal proteaz örneğine karşın, alkalifilik *N. pharaonis* proteaz enzimi ise 3 mM kadar düşük tuz konsantrasyonunda işlevini sürdürmektedir (Eisenberg ve Wachtel, 1987). Bu özellikleri nedeniyle bu tür ekstremozimlerin deterjan katkı maddesi olarak kullanışlı oldukları görülmektedir (Horikoshi, 1999).

1.4.1. Halofilik Enzim Çözünürlüğü ve Stabiliteleri

Yunanca kökenli olan hals; tuz ve phile ise sevmek anlamına gelmektedir ve halofilik mikroorganizmalarda fonksiyon yeteneği için tuza olan ihtiyacı ifade eder. Halofilik mikroorganizmalara ait enzimler, elde edildikleri organizmanın halofilliğine veya aktivitelerine, stabiliteleri ve çözünebilirlikleri için gerekli olan tuz miktarına göre tanımlanırlar (Çizelge 1. 3.) (Madern ve ark., 2000).

Çizelge 1.3. Bazı halofillerin ürettiği ekstremofil enzimleri (Gomes ve Steiner, 2004)

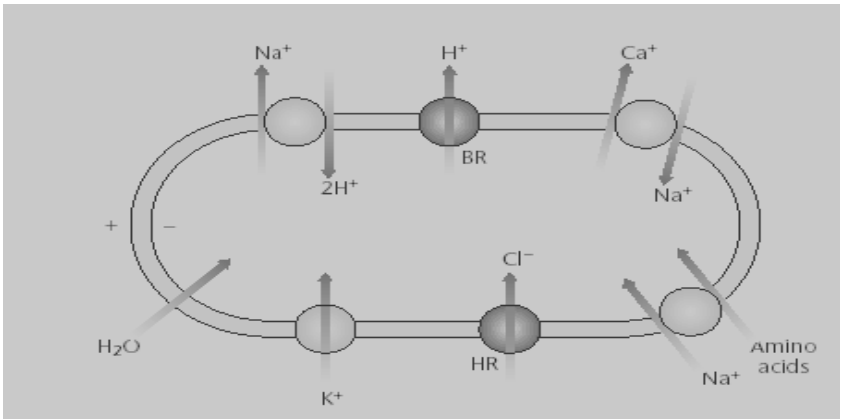
Halofiller	**Halofilik Enzimler**	**Optimum Sıcaklık (°C)**	**Optimum pH**	**Referans**
Halothermothrix orenii	α-Amilaz	65	7.5	Mijts ve ark., 2002
Bacillus dipsosauri	α-Amilaz	60	6.5	Deutch, 2002
Halobacillus sp. MA-2 suşu	Amilaz	50	7.5-8.5	Amoozegar ve ark., 2003
Haloferax mediterranei	α-Amilaz	50-60	7.0-8.0	Perez-Pomares ve ark., 2003
Halophilic bacterium, CL8	Ksilanaz 1 Ksilanaz 2	60 65	6.0 6.0	Wejse ve ark., 2003
Halorhabdus utahensis	β-Ksilanaz β-Ksilozidaz	55, 70 65	- -	Waino ve Ingvorsen, 2003
Pseudoalteromonas sp. CP76 suşu	Proteaz CPI	55	8.5	Sanchez-Porro ve ark., 2003

Halofilik olan enzimler yüksek konsantrasyonda NaCl çözeltilerinde çözünebilirler. Halofilik mikroorganizmalarda proteinler yüksek miktarda sitoplazmik KCl konsantrasyonlarında stabil ve çözünebilir olmalarını sağlayan spesifik mekanizmalar içerir. Bu adaptasyon mekanizmaları çözücü etkileşimlerine ve halofilik proteinlerin 3 boyutlu yapılarına aktarılır. Stabilite ve aktivite tamamen çözücü çevresine bağlı olan protein dinamiği ile ilişkilidir. Nötron fırlatılması ile oluşan tuz durumunun fonksiyonu gibi halofilik protein dinamiği halen araştırma konusudur. Halofilik proteinlerin *E. coli*' de ekspresyonu yapıldığında, amonyum

sülfat konakçı proteinlerin çoğunu çöktürür. Bu durum ise saflaştırma için bir avantajdır (Madern ve ark., 2000).

1.4.2. Halofilik Mikroorganizmaların Tuz Toleransları ve Metabolizmaları

Halofilik mikroorganizmalar genel olarak çubuk ve kok şekillerine sahiptirler. Birçok ekstrem halofilik mikroorganizma hücre bütünlüğünü sadece NaCl veya KCl varlığında sürdürürler. Tuz konsantrasyonu düştüğünde hücre morfolojilerini düz çubuk şeklinden, küre haline dönüştürürler. Genellikle tuz konsantrasyonu 1M civarında olduğunda lizize uğrarlar. Halofilik mikroorganizmalar temel olarak yüksek tuz içeren ortamlara adaptasyon için iki strateji geliştirmişlerdir. Halofilik arkealar, sitoplazmalarını ozmotik dengede tutmak için ortamda bulunan tuzu depolarlar. Ozmoregülasyonun bu mekanizması ortamda yüksek miktarda tuz varlığında hücre içi enzimler ile bazı özel adaptasyonları gerektirir. Diğer yönteme göre ise, halofilik ya da halotolerant bakterilerin hücre içi tuz konsantrasyonları düşüktür ve hücre içi enzimlerin özel bir tuz toleransları yoktur. Dış ortam ile ozmotik dengeyi ortamda çözünmüş olarak bulunan yüksek konsantrasyonlu çeşitli organik ozmotik bileşenleri depo ederek devam ettirirler (Şekil 1.5.) (Danson ve Hough, 1998).



Şekil 1.5. İyonların ve diğer moleküllerin halofilik bakterilerde membran boyunca geçiş hareketleri (Danson ve Hough, 1998).

1.4.3. Halofil Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Açıdan Önemi

Halotolerant veya halofilik mikroorganizmalar da biyoteknolojinin bazı alanlarında çeşitli potansiyel uygulamalara sahiptir. Halofilik mikroorganizmaların ürettiği bakteriyorodopsinin teknik alanlarda uygulamalarının bazılarına holografik depo materyali, uzaysal ışık modülatörleri, optik hesaplama ve optik hafıza olarak kullanımları örnek verilebilir. Bakteriyorodopsin ışık aracılığı ile membrandan iyonların geçişine olanak sağlayan retinal bir pigmenttir. Bakteriyorodopsin dışarıya elektron pompalayarak enerji elde edilmesini sağlar. Petrolün mikrobiyolojik geri kazanımı konusunda bu mikroorganizmalara ait biyosürfektanlar ve ekzopolisakkaritler oldukça ilgi çekmektedir. Biyoteknolojik açıdan kullanışlı olan diğer biyomalzemeler ise halofilik enzimlerdir. Aşırı yüksek yoğunluklardaki tuzlu ortamda aktif olan yeni izomerazlar ve hidrolazlar bu halofilik enzimlere örnek olarak verilebilir (Margesin ve Schinner, 2001).

Halofil mikroorganizmalar araştırmalarda çok tercih edilen bir ekstremofil gruptur. Bunun nedenleri, diğer ekstremofil mikroorganizmalara nazaran daha kolay kültürlerinin yapılabilmesi, aseptik şartlara olan ihtiyacının az olması sayılmaktadır. Bunun yanında günümüze kadar ekstremofil mikroorganizmalar ile ilgili olarak alınan patentlerin %20 si halofillerle ilgilidir (Horikoshi ve Grant, 1998).

Birçok halofilik enzim 1 M NaCl altındaki konsantrasyonlarda inaktivasyona uğrar ve denatüre olurlar. Yüksek tuz konsantrasyonlarında çözünebilir olduklarından standart kromatografik uygulamaların kullanımını güçleştirir (Margesin ve Schinner, 2001). Halofilik enzim stabilitesinin, aktivitesi ve çözünürlüğünü belirlemeye yönelik çalışmalar yoğun olmasına karşın halofilik mikroorganizmalara ait ekstremozimlerin potansiyel kullanımına dair gelişim henüz azdır. Halofilik arkealara ait ekstremozimler tuza son derece dayanıklı olmalarının yanısıra çevrelerindeki uzun süreli yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklıdırlar. Yani termotolerant özelliklere de sahiptirler. Bunun yanında halofilik enzimler tuzla zenginleştirilmiş koruma kalkanına sahiptir. Böylece düşük su aktivitesi, yüksek

organik çözücü seviyelerinde katalitik aktivitelerini sürdürmektedirler. Tüm bu özellikleri nedeni ile birçok uygulama için ilgi çekici hale gelmektedirler. Bununla beraber halofilik arkealara ait ticari değere sahip ekstremozim örnekleri vardır (Eichler, 2001).

1.5. Mutasyon

Canlıların karakterlerini nesilden nesile aktaran genetik materyalde, yani kromozom veya genlerde meydana gelen ve kalıcı olabilen ani değişiklere mutasyon denmektedir. Mutasyonlar, çeşitli sebeplerle organizmalarda zaman zaman ortaya çıkan ve tabiatta çok az rastlanan genetik mesajdaki sapmalardır. Birçoklarının sebebi bilinememekle beraber aşırı ısı, x-ışınları, beta ve gamma ışınları, çeşitli madde ve zehirler mutasyonlara sebep olan etkenlerdir. Laboratuvar şartlarında sun' i mutasyonlar meydana getirmek için en çok x-ışınları kullanılmaktadır Üzerinde genetik çalışma yapılan bütün canlılarda mutasyona rastlanmıştır. Normalde genetik materyal bir değişikliğe uğramadan kendini eşlemeye meyillidir. Fakat bilinen ve bilinmeyen pekçok sebeple bu düzen bozulabilmekte ve mutasyonlar meydana gelmektedir. Bunun sonucunda ana ve babadan bir veya birkaç karakter bakımından değişik yavrular doğabilir. Mesela; *Drosophila*' nın (sirke sineği) normal göz rengi koyu kırmızıdır. Fakat göz rengini kontrol eden genlerin mutasyona uğraması sonucu göz rengi beyaz, pembe, turuncu veya kahverengi, hatta bu renklerin değişik tonlarında olan yavrular ortaya çıkabilir. Laboratuvarlarda x-ışınlarına maruz bırakılmış gri vücutlu, kırmızı gözlü ve normal kanatlı sirke sineklerinden; sarı vücutlu, beyaz gözlü, kesik veya kıvrık kanatlı mutantlar (mutasyona uğramış bireyler) elde edilmiştir.

Mutasyonun tesirlerinin nesilden nesile geçebilmesi için üreme hücrelerinde meydana gelmesi gerekir. Üreme hücreleri dışındaki vücut hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar "Somatik Mutasyonlar" olarak adlandırılırlar. Bunlar ebeveynde kalıcı olup, doğacak nesillere aktarılamaz. Esas önemli olan üreme hücrelerinde meydana gelen mutasyonlardır. Hayatla bağdaşabilen gen mutasyonlarıyla albinizm,

orak hücreli anemi (kansızlık) gibi irsi hastalıklar meydana gelir. Öldürücü mutasyonlarda ise, döllenmiş yumurta ergin evreye kadar gelişmeden ölür.

1.5.1. Mutasyonların Sınıflandırılması

A Genişliğine göre mutasyonlar:

1 Kromozom mutasyonları

Kromozomların yapılarında meydana gelen değişiklikler sonucu ortaya çıkarlar ve mikroskopta gözlenebilirler. Dört grup altında incelenirler:

a Translokasyon: Bir kromozom parçasının veya tamamının başka bir kromozoma eklenmesidir.

b İnversiyon: Bir kromozomun bir bölgesinden kopan parçasının 180 derece dönmesi ve yine koptuğu yere yerleşmesidir. Böylece genlerin sırası değişir.

c Delasyon: Bir kromozom parçasının koparak dağılması ve böylece bir grup genin eksilmesidir.

d Ayrılmama: Mayoz bölünme esnasında bir homolog kromozom çiftinin birbirinden ayrılmayıp aynı gamete geçmesi, böylece bir gamette kromozom sayısının artması, bir diğerinde eksilmesidir. Bu mutasyonlarda etkilenen gen miktarı çok sayıda olduğundan etkileri de şiddetli olur ve ekseri öldürücüdür.

2 Nokta mutasyonları

Mikroskopta gözlenemeyen DNA' daki organik bazların (adenin, guanin, timin sitozin) değişimiyle meydana gelen mutasyonlardır. Genlerin yapısını değiştirirler ve hangi gende yer aldığı genetik çaprazlamalar sonucu anlaşılabilir. Nokta mutasyonları da üç grupta incelenebilir:

a Transisyon: Bir pürin bazı başka bir pürin bazı ve bir pirimidin bazı da başka bir pirimidin bazı ile yer değiştirmiştir. (A ve G pürin, T ve C pirimidin bazlarıdır). Bir gendeki AT (Adenin-Timin) baz çifti yerine GC(Guanin-Sitozin) çiftinin geçmesi gibi.

b Transversiyon: Bir pürin bazının yerini bir pirimidin bazı veya bir pirimidin bazının yerini bir pürin bazı almıştır. AT veya GC çifti yerine TA veya CG çiftinin geçmesi gibi.

c Delasyon: Bir veya daha fazla nükleotit çiftinin DNA molekülünden koparak eksilmesidir.

B Oluş mekanizmasına göre mutasyonlar:

1 Kendiliğinden Mutasyonlar: Normal şartlarda bunların meydana gelme nispeti çok çok düşüktür.

Mesela bir bakteri hücresinin bir tek geninin bir hücre bölünmesinde kendiliğinden mutasyona uğrama ihtimali (10 -10) kadardır. Bu ihtimal iki genin beraber mutasyona uğraması için (10 -14) kadardır.

2 Uyarılmış Mutasyonlar: Çeşitli etkenler (ajanlar) genetik materyali etkileyerek mutasyona sebep olabilirler. Bu amillere mutajen denir.

1.5.2. Kimyasal Mutajenler

Kimyasal ajanlar etki şekillerine göre üç grupta incelenmiştir (Hopwood,1970).

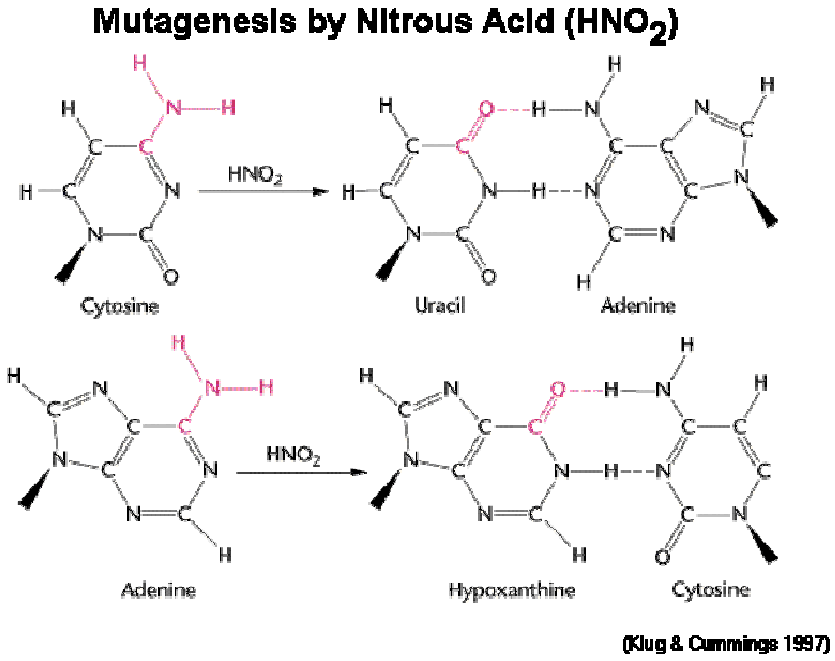
1 DNA molekülleri üzerinde yer alan purin ve pirimidin bir veya bir kaçının kimyasal yapısını değiştiren nitrous asit ve alkilleyici ajanlar (EMS, EES, DES, NTG).

2 Baz analoglarıdır. Nükleik asitin replikasyonu esnasında yeni sentezlenen zincire yerleşerek bazların tautomerik formlarında olduğu gibi yanlış baz eşleşmelerine neden olurlar.

3 Çerçeve kayması mutasyonlarına neden olan akridinler ve ICR gibi nitrojen mustard derivasyonlardır.

1.5.2.1. Nitrous asit (HNO_2)

Nitröz asit, oksidatif deaminasyon yolu ile öncelikle amino grupları enol ve keto gruplarına dönüştürür. Böylece sitozin, adenin ve guanin sırasıyla urasil, hipoksantin ve ksantine dönüştürülür. Sonuçta urasil adenin ile baz çifti yaparak GC → AT transisyonu, hipoksantin sitozinle baz çifti yaparak AT → GC transisyonu, ksantinde adenin ile baz çifti yaparak AT→ GC transisyonu oluşur (Şekil 1.6.).



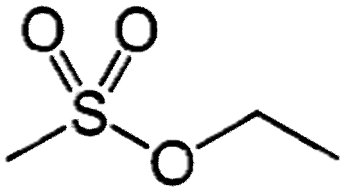
Şekil 1.6. Nitrö asit mutagenesizinin mekanizması

1.5.2.2. Ethyl methanesulphonate (EMS)

Etil metansülfonat (EMS) $CH_3SO_3C_2H_5$ (Şekil 1.7.) formül ile, mutajenik teratojenik ve muhtemelen kanserojen organik bir bileşiktir. Bu nükleotid ikamesi yoluyla genetik materyalında rastgele mutasyonların üretir; özellikle guanin alkilasyonuyla. Genellikle tek nokta mutasyonlarını üretir. Bu öldürmeden gen başına 5×10^{-4} ila 5×10^{-2} oranında mutasyonlar neden olabilir.

Etilmetan sülfonat (EMS)'ın etil grubu DNA'daki guanin ile reaksiyona girer, anormal O-6-ethylguanine oluştururlar. DNA replikasyonu sırasında, işlem katalize eden DNA polimerazların, sık sık O-6-ethylguanine karşısında sitozinin yerine, timin yerleştirirler. Bu replikasyon çoğaldıkça, orijinal G:C baz çifti yerine bir A:T çifti

olabilir. Bu durum, genetik bilgisini değiştirir, genellikle hücrelere zararlıdır ve hastalık ile sonuçlanabilir. EMS genellikle bir mutajen olarak genetikde kullanılır.

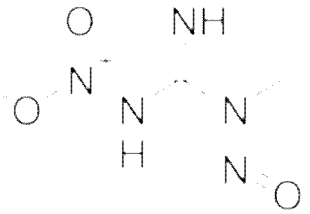


CH_3-SO_2-O-CH_2-CH_3

Şekil 1.7. Ethyl methanesulphonate'ın (EMS) kimyasal yapısı

1.5.2.3. N-methyl-N'-nitrosoguanidin (NTG)

Çok etkili bir mutajendir (Şekil 1.8.). Bu mutagenin hem popolasyon üzerindeki öldürme etksi çok yüksektir hem de canlı kalan hücrelerdeki mutasyon frekansı çok yüksektir. *Salmonella typhimurium* (Eisenstark ve ark., 1965), *Saccharomyces pombe* (Megent, 1965) ve *Streptomyces coelicoler*'de (Hopwood, 1970) NTG ile yapılan çalışmalar canlı kalan hücrelerden %8-10'nun okzotrof (ouxotrophs) olduğunu göstermiştir. Bu kimyasalın en büyük dezavantajı kullanımının çok fazla dikkat gerektirmesidir. Ayrıca istenen mutasyon etkilerinin yanı sıra başka mutasyonlara yol açması mutantların analizini güçleştirmektedir. Ortalama kullanım miktarı 0.1-1 mg/ml (*E.coli* için)'dir. Nitrosoguanidin (MNNG), en bariz etkisini N^7 pozisyonuna alkil grubu bağlayarak (N^7-Ethyl-guanin) oluşturmaktadır. Transisyon, transversiyon ve küçük delesyon mutasyonlarına neden olur (Whitfield, 1966). Alkilleyici mutajenler tercihen replikasyon çatalı civarında daha etkilidir. Bunun nedeni DNA-polimerazın substratı olan serbest nükleotidlerin mevcut DNA yapı taşlarına nazaran alkillenmeye daha müsait olmalrıdır. *E.coli* üzerinde yapılan çalışmalar MNNG ile oluşturulan mutasyonların %30'unun, EMS ile oluşturulan mutantların %70'inin replikasyon çatalında direk baz eşleşmelerinin değişmesiyle meydana geldiği, geriye kalan mutasyon oranında eksik tamir mekanizmasının etken olduğu belirlenmiştir (Hopwood, 1970).

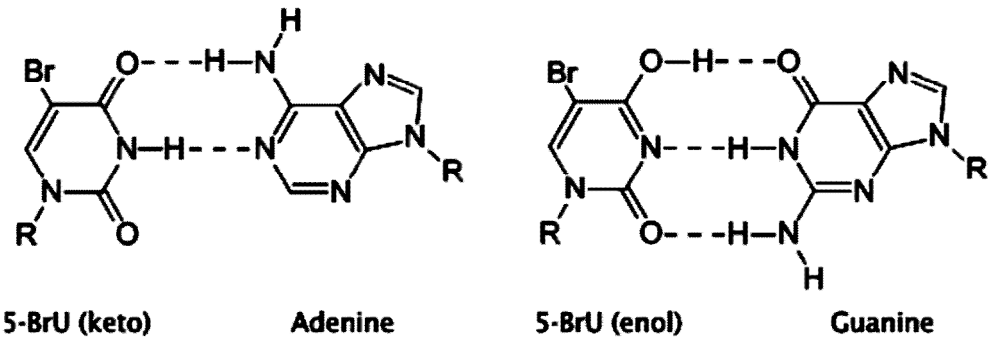


Şekil 1.8. 1-methyl-2-nitro-1-nitrosoguanidinenin molekül yapısı

1.5.2.4. Baz analogları

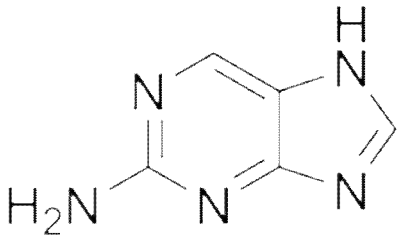
Nükleik asit biyosentezi sırasında, pürin ve pirimidinlerin yerine geçebilen moleküllerdir ve genellikle mutajenik kimyasallardır. Baz analogları, pürin ve pirimidin bazlarından hangisine benziyorsa, replikasyon sırasında benzerinin yerine geçebilir, ancak normal bazlara kıyasla daha yüksek oranda hatalı baz çifti yaptıklarından mutasyon hızını artırırlar.

5-Bromourasil: Timin analoğu gibi davranır (metil grubu yerine brom atomu) Tautomerik bir kaymanın gerçekleşme olasılığını arttırır. Enol tautomer çiftleri guanin ve adenin ile eşleşir (Şekil 1.9.).



Şekil 1.9. 5-BrU tautomerik formları.

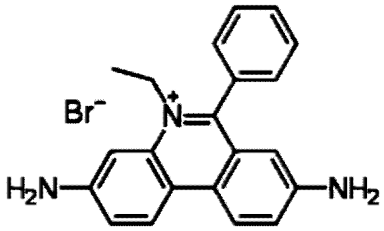
2-aminopürin: 2-amino purin (Şekil 1.10.), adenin analoğu olarak hizmet verebilir (6- mino purin). Timin ile eşleşmeye yatkındır, replikasyonu takiben sitozin ile de eşleşerek olası transisyonlara yolaçar.



Şekil 1.10. 2-amino purinin kimyasal yapısı

1.5.2.5. Akridinler

Proflavin ve ICR bilinen farklı mutasyon etkisi ile rutin kullanıma uygun bir kimyasal grubudur (Şekil 1.11.).



Şekil 1.11. EtBrnin kimyasal yapısı.

Etkilerini okuma penceresini kaydırmak suretiyle gösterirler (Crick ve ark., 1961; Streisinger ve ark., 1966; Ames ve Whitfield, 1966). Akridinlerin T2 ve T4 fajlarında mutasyon etkisinin yüksek olması bu fajlarda gerçekleşen replikasyona bağlanmış ve akridinlerin mutasyon etkisi ile rekombinasyon mekanizması arasında bir ilişki olduğu düşünülmüştür (Orgel ve Brenner, 1961). Akridinlerin bazlar arasına girmesi krossin overi başlatmış olabilir (Lerman, 1963). Akridinler konusundaki diğer bir hususta ancak karanlıkta uygulandığında etkili bir mutasyon oluşturabilmesidir (Ritchie, 1965).

1.5.2.6. Radyasyon

Ultraviole radyasyon bakterilerde hem baz değişimlerini hem de delesyon mutasyonlarını indükler. Zayıfta olsa çerçeve kayması tipindeki mutasyonlarada sebep olabilmektedir (Berger ve ark., 1966). Fotokimyasal mutasyonları temir eden

bir çok enzim sistemi vardır. Bu enzim sistemindeki yanlışlıklar mutasyonun oluşmasını daha etkili kılar. X-ışınları da mutasyon amacıyla bakteri ve virüslerde kullanılmaktadır (Brown, 1966; Schwartz ve Beckwith, 1969).

1.6. Amaç

Bu çalışmanın amacı; farklı bölgelerde bulunan tuzlu ve bazik ortamlardan (tuz ve sodalı göllerinden) haloalkalifilik bakteri izolasyonunu gerçekleştirmek, bu bakterilerce üretilen endüstriyel öneme sahip enzimlerin (α-amilaz, ksilanaz, likenaz, CMCaz) moleküler bioloji yöntemleriyle üretimlerinin artırılması imkanlarını araştırmak, son olarak bu enzimlerin karakterizasyonunu gerçekleştirerek hayvan besleme alanında yem katkı maddesi olarak kullanma olanaklarını belirlemektir.

1.7. Kapsam

Projenin kapsamı ise aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1 Van Gölü ve Khazar Denizi kıyılarından toprak ve su numuneleri ile Çukurova Üniversitesi kampüsünden toprak numunesinin alınması.
2 Alınan numuneleri 80 °C' de 10 dk inkübe edilerek vejetatif hücrelerin öldürülmesi (pastörizasyon).
3 Numunelerin LB ve L gibi zengin besiyerlerine aktarılarak bakteri sporlarının aerobik ortamda çimlenmesinin sağlanması.
4 Çimlenen sporların katı besiyerlerinde koloni oluşturmalarının sağlanması ve sonrasında bu kolonilerden tek tek seçim yapılması.
5 İzolatların nişasta, CMC, ksilan, likenan, inülin, gibi substratlar içeren katı besiyerlerine ekilerek ilgili enzim aktivitelerinin tespit edilmesi.
6 İzolatların 16S rRNA gen analizleri ile filogenetik analizlerinin yapılması ve türlerinin tespiti.
7 İzolatların çeşitli mutajenlerle muamele edilerek mutant varyetelerinin oluşturulması.

8 Mutant ve orijinal suşların enzim üretim miktarlarının karşılaştırılarak kantitatif enzim analizler ile farklılıkların ortaya konulması.

9 SDS-PAGE ve zymogram analizleri ile enzimlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Amilazla İlgili Yapılmış Çalışmalar

Kneen ve Sandstedt (1946), bakteriyel kökenli amilazların diğer alfa-amilazlardan daha yüksek sıcaklık stabilitesine sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Stark ve Tetrault (1951), amilaz enzimini üreten *Bacillus stearothermophilus* bakterisinin izolasyonunu 70°C ve pH 6.4' te olduğunu ve enzim inaktivasyon sıcaklığının 90°C olduğunu bulmuşlardır.

Hartman ve ark. (1955), *Bacillus stearothermophilus*' dan ürettikleri termofilik amilaz enziminin pH ve termal stabilitelerini belirlemişler ve bu termofilik bakteriyel amilazın, mezofilik amilazlara göre daha yüksek pH stabilitesine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca enzimin optimum sıcaklığının 60 °C ve pH'ının 5.25-7.5 arasında olduğunu bulmuşlardır.

Onishi ve Sonoda (1979), orta seviyede bir halofilik olan *Micrococcus halobius*' un amilazlarının optimum aktivitesini 50-55 °C sıcaklıklarda 0,25 M NaCl veya 0,75 M KCl içeren ortamda pH 6.0-7.0 arasında olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırıcılar enzimin moleküler ağırlığını 89 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Morgan ve Priest (1981), izolasyonunu yaptıkları *Bacillus licheniformis* NCIB 6346 suşundan saflaştırdıkları α-amilaz enziminin optimum sıcaklığını 70-90°C arasında olduğunu, pH 7.0-10.0 arasında stabile olduğunu ve moleküler ağırlığını ise 62.65 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (1983), besin ortamında glisin bulunması durumda *Bacillus amyloliquefaciens* suşunun alfa-amilaz üretimini arttırdığını, bu etkinin glisinin murein tabakasının sentezinde rekabetçi inhibisyona neden olmasın dan kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Bajpai ve Bajpai (1987), termostabil alfa-amilaz üreten *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13 suşunun pH 3.0-11.0 arasında ürediği ve besiyeri pH'ının yükseltilmesiyle üremenin azaldığını, enzim üretiminin pH 5.0-10.0 aralığında olduğunu ve maksimum enzim aktivitesinin pH 6.0-9.0 arasında gerçekleştşğini bildirmişlerdir. Suşun enzim üretim sıcaklık aralığının 25-50 °C ve maksimum enzim

üretim sıcaklığının ise 35°C olduğunu, bunun yanı sıra nişastanın sıvılaştırılması amacıyla bu enzimin geniş pH aralıklarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Srivastava (1987), toprak numunesinden *Bacillus stearothermophilus* suşunu izole ederek, bu suştan optimum aktivitesi 80 °C ve pH 6.9 olan α-amilaz ve β-amilaz şeklinde iki farklı enzimi karakterize etmiştir. Araştırıcı α-amilazın moleküler ağırlığını 48 kDa, β-amilazın moleküler ağırlığını ise 57 kDa olduğunu bildirmiştir.

Igarashi ve ark. (1998), alkalifilik *Bacillus* türleri izole ederek bu türlerden alkali izoamilaz, alkali dirençli neopullulanaz ve yüksek alkali olan pullulanaz gibi bazı enzimlerin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu enzimlerin alkali koşullarda alfa-amilazlar ile birlikte çamaşır ve bulaşık deterjan sanayisinde etkili olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca izolasyonunu yaptıkları amilazın maksimum aktivitesini 55 °C ve pH 8.0-8.5 civarında olduğunu ve moleküler ağırlığının ise 53 kDa olduğunu bulmuşlardır.

Kim ve ark. (1995), alkalifilik bir *Bacillus* sp. suşundan en iyi aktivitesi pH 11.0 ve 12.0' de olan, maltotrioz üreten alkali α-amilaz üretimini sağlamışlardır.

Lin ve ark. (1998), izole ettikleri *Bacillus* sp. TS-23 suşunda amilaz aktivitesini belirlemişler ve moleküler ağırlıkları 42 ve 150 kDa olan iki amilaz bandı bulmuşlardır. İzole ettikleri amilaz enziminin optimum pH'sını 9.0 ve optimum sıcaklığının 70 °C olduğunu bildrerek enzimin ham nişastayı kısmen parçalayabildiğini rapor etmişlerdir.

Duedahl-Olesen ve ark. (2000), *Bacillus clausii*' den moleküler ağırlığı 101 kDa olan ve nişastadan maltoheksoz oluşturabilen amilaz izolasyonu ve karakterizasyonu yapmışlardır. Ayrıca bu enzimin optimum pH'sını 9.5 ve optimum sıcaklığını 55 °C olarak belirlemişlerdir..

Hagihara ve ark. (2001), *Bacillus* sp. KSM-K38 suşunda şelatörlere ve kimyasal oksidantlara karşı oldukça dirençli olduğunu bildirdikleri ve molekül ağırlığı 55 kDa, optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 8.0-9.5 ve 55-60 °C olan α-amilazı karakterize etmişlerdir.

Arıkan ve ark. (2003), alkali toprak örneklerinden izole ettikleri termostabil ve şelatör dirençli *Bacillus* sp. ANT-6' dan amilaz enziminin pH 10.5 ve 80 °C' de optimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Nişasta, tekstil ve deterjan endüstrisi

için yüksek bir potansiyele sahip olduğunu ve enzimin moleküler ağırlığının ise 94.5 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Das ve ark. (2004), *Bacillus subtilis* suşundan, optimum sıcaklığı 52-55 °C ve pH'sı 9.0 olan alkali alfa-amilaz izolasyonunu yapmışlar ve bu enzimin moleküler ağırlığı 42.8 kDa olarak belirtmişlerdir.

Bernhardsdotter ve ark. (2005), *Bacillus sp.* L1711 suşundan EDTA varlığında aktivitesi yükselen ve alkali şelatör dirençli fakat Ca^{+2} varlığında termostabilitesi yükselmeyen amilazın izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Saxena ve ark. (2007), amilaz enzimini izole ederek maksimum aktivitesini 90 °C sıcaklıkta ve pH 10.0' da gerçekleştirdiğini, enzimin 80-100 °C sıcaklık aralığında %100 stabil davranış gösterdiğini belirlemişlerdir.

Asgher ve ark. (2007), *Bacillus subtilis*' den izole ettikleri termostabil α-amilaz optimum aktivitesinin pH 8.0 ve 70°C'de gerçekleştiğini, enzimin 60°C sıcaklıkta 1 saat süreyle stabilitesini koruduğunu bildirmişlerdir.

Aygan (2008), optimum sıcaklığı 150°C ve optimum pH'ı 10.5 olan *Bacillus sp.* AB-17 suşuna ait amilaz izolasyonunu gerçekleştirmiş ve enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 150°C ve10.5 olduğunu bildirmiştir.

2.2. Selülaz (CMCaz)' la İlgili Yapılmış Çalışmalar

Robson ve Chambliss (1984), *Bacillus sp*. izolatından elde edilen selülaz enziminin aktivite analizini yapmışlar ve maksimum selülaz (CMCaz) aktivitesinin pH 4.8' de ve 58 °C sıcaklıkta gerçekleştiğini belirlemişlerdir.

Hreggvidsson ve ark. (1996), *Rhodothermus marinus*' tan izole edilen termostabil selülaz (CMCaz) enziminin optimum aktivitesinin pH 7.0' de olduğunu saptayarak enzimin 100 °C sıcaklıkta 3,5 saat bekletildiğinde orijinal aktivitesinin %50' sini koruduğunu belirlemişlerdir.

Bok ve ark. (1998), *Thermotoga neapolitana* bakterisinden moleküler ağırlıkları 29 ve 30 kDa olan iki termostabil endoselülaz izolasyonu yapmışlar ve enzimlerin pH 6.0-6.6 aralığında ve 95 °C sıcaklıkta aktif olduklarını saptamışlardır.

Krishna (1999), *B. subtilis*' ten selülaz enzimi üretimini katı faz fermentasyon tekniği ile sağlamışlar ve substrat, nem, parça büyüklüğü, ortam pH'ı, inkübasyon sıcaklığı ile azot ve karbonun enzim üretimi üzerine etkilerini araştırmışlardır.

Mawadza ve ark. (2000), iki *Bacillus* suşundan üretilen selülazı karakterize ederek, iki enzimin de molekül ağırlığının 40 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca enzimlerin optimum aktivitelerini pH 5.0-6.5 aralığında ve 65 °C ve 70°C sıcaklık değerlerinde gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Singh ve ark. (2001), *Bacillus sp.* VG1 suşundan termostabil alkali karboksimetil selülaz enzimini izole ederek 9.0-10.0 pH aralığında optimum aktivite gösterdiği ve yarılanma süresinin ise 100 °C sıcaklıkta 12 dakika olduğunu bulmuşlardır.

Endo ve ark. (2001), *Bacillus sp.* KSM-N252 suşundan izole edilen endoglukanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerinin sırasıyla 10.0 ve 55 °C, moleküler ağırlığının ise 50 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Hakamada ve ark. (2002), alkalin endoglukanaz enzimini *Bacillus circulans*' dan izole ederek pH' ı 8.5 ve 55 °C sıcaklıkda optimum aktvite gösterdiğini, moleküler ağırlığının ise 43 kDa olduğunu saptamışlardır.

Singh ve ark. (2004), *Bacillus sphaericus* JS1 suşundan alkali selülaz enzimi izole ederek enzimin üretimi ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Moleküler ağırlığı 42 kDa, optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 60– 70 °C ve 8.0-10.0 olan enzimin, deterjan sanayi için uygun olduğu belirtmişlerdir.

Kim ve ark. (2005), alkalifilik *Bacillus sp*. suşundan HSH-810' dan alkali selülaz izolasyonu yapmışlardır. Enzimin optimum aktivitesinin pH 10.0' da ve 50 °C sıcaklıkta gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırıcılar enzimin moleküler ağırlığını ise 80 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Akita ve ark. (2005), *Bacillus halodurans* C-125 suşundan izole edilen selülaz enziminin ince tabaka kromatografisi analizinde endo özellik gösterdiğini bulmuşlardır. Enzimin optimum aktivitesini 60 °C sıcaklıkta pH 6 ve 8 de gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırıcılar enzimin 60 °C sıcaklıkta 2 saatlik inkübasyondan sonra akvitesini %100 koruduğunu, moleküler ağırlığının ise 31 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Kang ve ark. (2007), *Pyrococcus horikoshii*' den, kristalin selüloza karşı aktivitesi yüksek hipertermofilik selülaz izolasyonu yapmışlar ve enzimin disülfit bağına sahip olduğunu bulmuşlardır. Enzimin 5.5-6.0 pH değerlerinde ve 90 °C sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Aygan (2008), *Bacillus sp.* C-14 suşundan izole edilen endoglukanaz enziminin optimum aktivitesini 50 °C sıcaklıkta ve pH 11.0' de gerçekleştiğini tespit etmiş ve molekül ağırlığını ise 61 kDa olarak belirlemiştir.

2.3. Ksilanazla İlgili Yapılmış Çalışmalar

Blanco ve ark. (1995), *Bacillus sp*. BP23' den izole ettikleri ksilanaz enziminin özelliklerini belirlemişler, enzimin 32 kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu ve optimum aktivitesini 50 °C ve pH 5.5' de gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yang ve ark. (1995), kağıt hamurundan izole ettikleri alkalifilik *Bacillus sp.* V1-4 tarafından üretilen alkali ksilanazın maksimum aktivitesini pH 8.5 ve 55 °C sıcaklıkta gösterdiğini bildirmişlerdir.

Lopez ve ark. (1998), alkali tolerant *Bacillus sp*. BP7' den izole edilen ksilanaz enziminin 45 °C sıcaklıkta ve pH 9.0' da 5 saatlik inkübasyonu sonunda orijinal aktivitesinin %72'sini koruduğunu bildirmişlerdir.

Breccia ve ark. (1998), *Bacillus amyloliquefaciens*' den termostabil ksilanaz izolasyonu ve karakterizasyonu yapmışlardır. Yaptıkları saflaştırma sonunda enzimin, 18.4 ve 19.6 kDa ağırlığa sahip iki alt birimden oluştuğunu belirtmişlerdir. Araştırıcılar enzim optimum aktivitesini pH 6.8 ve 7.0' de gösterdiğini, pH stabilitesi ise 9.0 olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığı 80 °C ve termal stabilitesinin ise 50 °C de olduğu bildirmişlerdir.

Sa-Pereira ve ark. (2002), sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *B. subtilis* organizmasından, selülaz aktivitesi bulunmayan termostabil ksilanaz enzimi üretmişlerdir. Enzim üretimini pH 6.0 da 50 °C sıcaklıkta 18 saat ve 55 °C sıcaklıkta 11 saatlik fermentasyon işlemleri uygulayarak, enzim verimini karşılaştırmışlardır. Enzimlerin optimum aktivitelerini 60 °C sıcaklıkta ve pH 6.0' da gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Tseng ve ark. (2002), alkalifilik *Bacillus firmus* suşundan selülaz aktivitesi olmayan iki farklı ksilanazı izole etmişlerdir. Enzimlerin optimum aktivitelerini 37 °C sıcaklıkta ve pH 5.0-11.0' da gösterdiklerini saptamışlardır. Moleküler ağırlıklarını ise sırasıyla 45 ve 23 kDa olarak bildirmişlerdir.

Wejse ve ark. (2003), halofilik SX15 suşundan iki ekstrem halotolerant ksilanaz enzimi üreterek karakterizasyonunu yapmışlardır. İki alt birimden meydana gelmiş

olan ksilenaz enzimlerinden, ksilanaz-1'in optimum aktivitesini pH 6.0 ve 60 °C sıcaklıkta, ksilanaz-2'nin ise optimum 65 °C sıcaklıkta ve 4 M NaCl' de etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca moleküler ağırlığı 43 ve 62 kDa olan enzimlerin yarılanma ömürlerinin 60 °C sıcaklıkta sırasıyla 97 ve 192 dakikada olarak bildirmişlerdir.

Lama ve ark (2004), termofilik *Bacillus thermantarcticus*' dan termostabil ksilanaz ve β-ksilosidaz izolasyonu yapmışlardır. Ksilanaz için optimum aktivite sıcaklığını 80 °C ve pH 5.6 iken, β-ksilozidaz için 70°C sıcaklık ve pH 6.0 olarak bildirmişler, ayrıca ksilanazın moleküler ağırlığını 45 kDa, β-ksilosidazın ise 150 kDa olarak tesbit etmişlerdir.

Avcıoğlu ve ark (2005), topraktan izole ettikleri *Bacillus sp*. suşlarından ksilanaz üretimi ve karakterizasyonu yapmışlardır. Ksilanaz üretimini tarımsal atık ürünler üzerinde *Bacillus* sp. izolatlarının üretilmesi ile gerçekleştirmişlerdir. Optimum 70 °C sıcaklıkta ve pH 6.5' de aktivite gösteren üç endoksilanazın moleküler ağırlıkları sırasıyla 22, 23 ve 40 kDa olarak saptamışlardır.

Aygan (2008), *Bacillus sp.* X13 suşundan elde edilen ksilanaz enziminin optimum aktivitesini 40 ºC sıcaklıkta ve pH 6.0' da gerçekleştiğini bildirmiştir. Araştırıcı yapılan SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlıkları sırasıyla 108.4, 95.5, 80.6 ve 68.5 kDa olan dört band belirlediğini bildirmiştir.

Cuşkun (2010), Van Gölü kıyı şeridinden toplanan toprak örneklerinden alkalifil *Bacillus* sp. (37 °C ve pH: 11.5) izole etmiştir. 37 °C sıcaklıkta, %24 NaCl ve pH: 7.5' de ksilanaz aktivitesine sahip halofil*Bacillus* sp. TGB-3 suşuna ait ksilanaz enziminin optimum sıcaklığının 60 °C ve optimum pH'sının 7.0 olduğunu bildirmiştir. Araştırıcı zimogram analizleri sonucunda ksilanaz enziminin, moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak 52 kDa ve 48 kDa olan iki alt birimden meydana geldiğini bildirmiştir.

2.4. Mutasyonla İlgili Yapılmış Çalışmalar

Vogel ve Bonner (1956), MNNG ile yaptıkları mutasyon çalışmalarında gliserollü minimal besi yerinde muhafaza ettikleri B. subtilis'lerin LB-agar içeren minimal besi

yerindeki gelişmelerini karşılaştırmışlardır. Ayrıca bu besin ortamına farklı besin maddelerini ilave ederek bakteri gelişmelerini tekrar karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak miniml besi yerinde gelişmesini devam ettiren hücre oranının %30-35 olduğunu göstererek okzotrof mutant oranını belirlemişlerdir.

Sidhu ve ark. (1997), termostabil amilaz üretimi için *Bacillus* sp. MK716 suşunun geliştirme deneylerini yapmışlar ve EMS ile mutasyon çalışmaları sonucunda, enzim üretiminde 40 kat artış sağlandığını bildirmişlerdir.

Freese (1959), baz anologlarını (5-Bu, 2-AP) kullanarak farklı mutasyonlarla farklı çalışmalar yapmıştır. Araştırmacı 5-Bromil Urasil (5-Bu) ve 2-aminopurin (2-AP)'nin transisyona (purin yerine purin, pirimidin yerine pirimidin) neden olduğunu rapor etmiştir.

Morpurgo ve Sermonti (1959), çalışmalarında ilk kullanılan kimyasal mutajenlerden biri olan nitrojen mustardların etkilerini araştırmışlardır. DNA'nın replikasyonu öncesi gelişme döneminde yaptıkları uygulama ile bu tür kimyasalların etkilerini DNA üzerinde direk olarak göstermişlerdir.

Adelburg ve ark. (1965), etki mekanizması bakımından aynı grupta incelenen N-methyl-N'nitro– N-nitrosoguanidine (MNNG)'nin Ethyl-ethaneosulphate (EMS)'ye karşı daha güçlü ve bifonksiyonel etkiye sahip bir kimiyasal olduğunu göstermişlerdir.

Spizizen (1965), *Bacillus*'lar üzerinde sürdürdüğü transformasyon çalışmalarında kompotentliğin sporlanmayla ilgisi olduğunu belirtmiştir. Araştırmacı SpoA alel genlerini taşyan yabani tip *Bacıllus*'ların Spo⁻ mutantlara göre daha düşük transformasyon etkinliğine sahip olduğunu tespit etmiştir. Araştırmacı bu korelasyonun SpoA genin direk etkisi veya sekonder etkisinden dolayı olabileceğini de belirtmiştir.

Auerbach (1969), x-ray ışınların dozuna bağlı olarak iki farklı somatik mutasyon oranı belirlemiştir. Araştırıcı çalışmasında aynı tür organizma (*Ephesticpurpae*) kullanmasına rağmen farklı mutasyon oranları tespit etmiştir. Bu farklılığın nedenini ise organizmanın fizyolojik geçmişine bağlamıştır.

Yanofsky (1966), transisyon ile tranversiyona yaklaşımlarını değiştirerek baz analoglarından 2-aminopurin (2-AP)'ni kullanarak faj T4 protein ve triptofan

sentetaz A'da geriye dönüşüm (revers) mutasyonu uygulamışlar, fakat oluşan mutasyonların DNA yapısına yanlış giren baz analoğundan mı yoksa replikasyon anındaki yanlış eşleşmeden mi ileri geldiğini netleştirememişlerdir.

Berger ve ark. (1966), *Escherichia coli* Tryptofan synthetase-A geninde akridin türü kimyasal (ICR 191) ile indüklenen çerçeve kayması mutasyonlarını diğer kimyasalların (MNNG, EMS, 2-AP) ve UV ışığının oluşturduğu dönüşüm (revers) mutasyonlarla karşılaştırmışlardır. Bu amaçla *E.coli* W3110 bakterisini, 120 µg/ml L-tryptophan ve 6 µg/ml ICR191-A içeren 1 ml glukoz-tuz sıvı minimal besi yerinde 48 saat inkübe etmiş ve L-tryptophan okzotrof mutantları minimal-agar besi yerinden seçmiştir. Araştırmacılar daha sonra bir grup trpA CRM^- (crossreacting material) mutantları farklı kimyasallarla muameleye tabi tutmuş ve UV ışığıyla mutasyon sonucu oluşan revers mutantlar ile ICR191-A akridin türü mutajenle muamele sunucu oluşan mutantlar da çerçeve kayması mutasyonu gözlemlemiştir. Araştırıcılar diğer mutajenlerin (MNNG, EMS, 2-AP) çerçeve kayması mutasyonuna etkisini tesbit edememiştir. Çerçeve kayması sonucu değişen aminoasitleri kolum kromatografisiyle tesbit etmişlerdir.

Thompson ve Beker (1973), çalışmalarında kimyasal mutajenlerin mutasyon frekansı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Spontan mutasyonlara oranla kimyasal mutajenlerin mutasyon ferekansını %3 artırdığını rapor etmişlerdir.

Arwert ve Venema (1973), donör DNA'nın hücre duvarına bağlandığı yerde hücre duvarı zayıflatılan mutantlarda kompetentliği etkileyen faktörler üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar donör DNA'nın bağlandığı ve alındığı bölgenin 75.000 kDa protein komplekse sahip olduğunu ve ayrıca hücre içerisine alınan tek zencirli DNA'nın kromozomal DNA üzerindeki homoloğu bulunan bölgeye yerleştiğini saptamışlardır.

Saito ve Yamamoto (1975), *Bacillus licheniformis*'te α-amilaz üretimini etkileyen düzenleyici (regulatör) faktörleri incelemek amacıyla, *Bacillus lichniformis* 584'ün A1, C1, N69, N108, N116, F-4s, F-5s, F-12s ve F14s mutantlarını aynı metod ile elde etmişlerdir. Araştırmacılar yabani tip hücrelerin logaritmik dönemdeyken 200 µg N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) ile 37˚C sıcaklıkta 40 dk. muamelesi sonunda hücreler 0.05 M fosfat solüsyonu ile (pH 7.5) santrifüj ederek

yıkamışlar ve Brain-Heart-Infusion (BHI)-sıvı besi yerinde 37˚C sıcaklıkta gece boyu bekletilerek %0.5 ve %2 glukoz içeren AH-agar plaklarına yaymışlardır. 16 saat 50 ˚C sıcaklıkta inkübasyondan sonra plakları iyodin ile boyayarak amilaz pozitif olan mutantları belirlemişlerdir. Araştırmacılar mutant olmayan yabani tiplerin %0.5'den daha yüksek seviyede glukoz içeren besi yerinde, hücrenin gelişme döngüsünden kaynaklanan geçici represyona ve katabolit represyona karşı duyarsız kaldığını ileri sürmüşlerdir.

Yoneda (1982), geleneksel mutasyon yöntemleri ve gen klonlama tekniklerini birleştirerek, daha iyi suşlar geliştirmiştir. Bu türlerin seleksiyonunda direk seçme yöntemi olan antibiyotik resistanlık özelliğinden ve nişastalı plaklarda oluşan amilaz zonlarından faydalanmıştır. Araştırmacı kantatif enzim analizi yaparak enzim üretiminin 1500 kat artığını tesbit etmiştir.

Aiba ve ark. (1983), *Bacillus stearothermophilus*'dan elde edilen sıcaklığa dirençli α-amilaz genini pFB90 ve TB53 plazmidleri ile *B. stearothermophilus*'da tekrar klonlamışlardır. Rekombinant plazmidleri taşıyan *B. stearothermophilus*'un yabani tipi *B. stearothermophilus*'dan beş kat daha fazla α-amilaz ürettiği tesbit etmişlerdir.

Fugi ve ark. (1983), *Bacillus stearothermophilus*'a ait sıcaklığa dirençli proteaz genini, proteaz aktevitesi köreltilmiş *Bacillus stearothermophilus* (MO-3) ve *Bacillus subtilis* (MT-1) mutantına pTB90 vektörüyle (Km^r, Tc^r) aktarmışlardır. Araştırıcılar klonlamada kullanılacak olan mutant *Bacillus stearothermophilus* (MO-3)'u orijinal *Bacillus stearothermophilus*'u 20 mg/ml NTG içeren LB-sıvı besi yerinde 48˚C sıcaklıkta 15 dak. inkübasyona tabi tutularak elde etmişlerdir. Elde edilen mutant kolonileri ise L-casein-agar besi yerinde enzim zonu oluştrup oluşturmamalarına göre sınıflandırmışlardır.

Chen ve ark. (1985), protoplast füzyonuyla *Bacillus stearothermophilus*'un genetik analizini yapmak için *B. stearothermophilus* NUB36 yabani tipinin mutantlarından faydalanmışlardır. Bunun için *B. stearothermophilus* NUB36 yabani tipin mutantlarını kullanmışlardır. *B. stearothermophilus* NUB36'yı LB-agar plaklarında MNNG kristalı ile 60˚C sıcaklıkta 6-8 saat inkübe ederek mutant kolonileri elde etmişlerdir. İleri aşamada *B.subtilis*'ten alınan bu genlere eşdeğer gen markırlarını protoplast füzyonuyla okzotrof mutantlara aktarmışlardır.

Nicholson ve Chambliss (1985, 1986), *Bacillus subtilis*'lerde son ürün oluşumu ile baskılanma ve katabolit represyonda görev alan repA proteini nedeniyle baskılama arasındaki farkı amyR genin promotor bölgesinde meydana getirdikleri mutasyonla açıklamışlardır.

Özcan (1996), çerçeve kayması mutasyonlarına sebep olan ethidium bromid (EtBr) ugulayarak α-amilaz pozitif *Bacillus subtilis* ORBA (1) suşunu α-amilaz negatif bir suş haline dönüştürmüştür. Araştırmacı 9 adet mutant suş izole etmiş bunların SDS-PAGE'de incelenmesi sonucu hepsinin aynı mutant suş olduğu sonucuna ulaşmıştır. Son olarak araştırmacı *Bacillus subtilis* ORBA (1) suşu ile mutant suşa ait hücre dışı proteinleri SDS-PAGE ve SDS-Nişasta-PAGE jellerde karşılaştırarak α-amilaz aktivitesinin *Bacillus subtilis* ORBA (1) suşunda yer alan fakat mutant suşta bulunmayan yaklaşık 65 kDa'lık bir proteinden kaynaklandığı tesbit etmiştir.

Velesco ve ark. (1999), sekiz yabani tip *Brassica carinata* (C-39, C-46, C-49, C-53, C-56, C-62, C82 ve C101) bitkisinden, izole ettiği tohumları EMS ile muamele etmiş ve bu tohumları kullanarak elde ettikleri bitkilerde 3-4 yıl sonra glukozinolat içeriğinin yabani tip bitkilerden 20-30 $\mu molg^{-1}$ daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Böylece hidrolize olduğunda toksik etki gösteren glikozinolat içeriği azaltılmış mutant bitkiler elde etmişlerdir.

Liamas ve ark. (1999), *Halomonas evrihalina* F2-7 türüne erken exponensiyal dönemde hydroxylamine uygulamışlar ve böylece F2-7 türüne sümüksü (mukoid) özellik göstermeyen yani ekzopolisakkarit yapısı taşımayan mutantları tesbit etmişlerdir. Bunların ağır metallere ve antimikrobial ajanlara karşı hassasiyetlerini belirlemişler, S9R ve S10R rifampicine, mutantlarının S11N, S12N ve S13N mutantlarının ise nalidixic aside dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar aynı bakteri üzerinde Ethyl-methane-sulfonate, acridine orange ve mitomicine C gibi mutajenleri de denemişler fakat bunlardan hiç birini hydroxylaminin kadar etkili olmadığını tesbit etmişlerdir. Bu durumu hydroxylaminin çok küçük bir molekül olmasıdan dolayı dış ekzopolisakkarit (EPS) yapıya tutunup onu mutasyona uğrattığı şeklinde belirtmişlerdir.

Golyasnaya ve Turina (2000), çalışmalarında kültür yaşının ve MNNG kimyasal ajanın mutasyona etkisini incelemişlerdir. *Escherichia coli*'nin N-methyl-N'-nitro–

N-nitrosoguanidine (MNNG) ile mutasyon oranın kültürün yaşına ve pH değerine bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yine araştırmacılar geç logaritmik dönem ve erken durağan dönemde Rifampisin (transkripsyon inhibitör etkili) konulan kültür ortamında (pH 7.4) ve logaritmik dönemin ortalarında ise MNNG'nin hücreler üzerindeki mutajenik etkisinin arttığını, aynı işlem streptomiyesin için yapıldığında ise mutasyon ferekansının azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu veriler MNNG ile indüklenen mutasyonel DNA lezyonlarının (hasarlarının) DNA'nın transkripsyon ve translasyon seviyesine (teşviklenen) bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

O'sullivan ve İbrahim (2000), probiyotik bakteriler tarafından üretilen β-galaktozidaz enzim miktarını artırmak için iki bifidobakterium türü (*B. brevis* ve *B. longum*) ile *laktabacillus delbrueckii ssp., bulgaricus* ve S*treptococcus thermophilus* iki ayrı kimyasal ajanla (120 µl/ml EMS, 50 mg/ml MNNG) muameleye tabi tutmuştur.

Araştırmacı 25 adet mutant koloni elde etmiş ve bu mutantların yabani tiplerine göre β-galaktosidaz aktivitelerinin arttığını göstermiştir. Laktoz bulunan ortamda gelişen mutantlarda β-galaktosidaz artışını *L. delbrueckii ssp. bulgaricus'*da %137, *S.thermophilus*'da %104, *B. brevis*'de %70 ve *B. longum'da* %222 olarak belirlemiştir.

Tripathi ve ark. (2001), *Itaematococcus pluvialis* ultraviolet (UV), N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) ve ya ethyl methanesulphonate (EMS) ile uygulamaya tabi tutmuşlardır. UV ile muamelede zamanın artması ve EMS muamelesinde de konsantrasyonun artmasıyla canlı hücre sayısı azaldığını ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri mutantları, biyosentetik yolda karoteonid inhibitörü olarak etki eden herbisidler (difeniamine (diphenylamine) (15-90 µM), nikotin (160-320 µM) ve kompaktin (1.5-3.0 µM)ile tekrar muamele tabi tutarak elde ettikleri mutantların axtaxanthin üretiminin 2.2-3.2 kat arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar mutantların daha yüksek lycopene cyclase aktevitesi sergilendiğini de belirtmişlerdir.

Azin ve Noroozi (2001), antimetabolit olarak 2-deoxy-D-glucose'un kullanıldığı besi ortamlarında α-amilaz aşırı üretici *Aspergillus oryzae* mutantlarını elde etmişlerdir. Mutasyon için N-methyl-N'-nitro – N-nitrosoguanidine (MNNG) [4

mg/10 ml sitra solüsyonu (0.1 M, pH 5.0)], ultraviolet (U.V) (280 nm 20 cm mesafeden) ve Nitrous asit ($NaNO_2$) (0.2 µl pH 4.5 asetat solüsyonu içerisinde 0.07 µl $NaNO_2$ solüsyonu)'i ayrı ayrı uygulamışlardır. Mutasyon işleminden sonra plaklarda gelişen mutant hücrelerin seleksyonu önce H/C (zon büyüklüğü/hücre büyüklüğü)'ne göre yapmışlardır. $NaNO_2$, UV ve MNNG mutantları yabani tiplere karşlaştırdıklarında sırasıyla %65.3, %52.8 ve %39.4 daha yüksek H/C orana sahip olduğunu bildirmiştir. Ayrıca en yüksek mutasyon etkisini *Aspergillus oryzae* conidialarının nitrous asitle 4 dk muamelesi sonucu ile elde edildiği bildirilmiştir. Nitrous asit muamelesi sonunda oluşan H_8 mutantı yabani tiple karşılaştırdığı zaman 6.73 kez daha fazla dextrizinik ve 5.13 kez daha fazla sakkorojenik aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Kotchoni ve Shonukan (2002), soya fasulyesi fermantasyonundan izole ettikleri *Bacilluc pumilis'*i EMS ile mutasyona uygulamasına tabi tutmuşlar elde ettikleri mutantları yüksek glukoz konsantrasyonundan (%2.6 w/v) selülaz üretim seviyesine göre dört gruba bölmüşler ve grup-III ile grup-IV'ün selülaz üretiminin sırasıyla 6.2 mg ile 11.4 mg'ın üzerinde olduğunu tesbit etmişlerdir.

Bilgilisoy (2003), iki *Bacillus sp.* (RSKK244, RSKK246) enzim üretimini değiştirmek amacıyla Ethyl-methansulphonate (EMS) ve Etihidium Bromid (EtBr) ile mutasyona tabi tutmuştur. RSKK244 ve RSKK246'nın EMS ile muamelesi sonunda 244M1, 244M2 (likenaz$^-$, kisilanaz$^-$, CMCase$^-$, α-amilaz$^+$) ve 246M3 (likenaz$^+$, kisilanaz$^+$, CMCase$^-$, α-amilaz$^+$) kolonileri tesbit etmiştir. Enzim üretimini arttırmak ve yeni enzim kombinasyonları elde etmek için kisilanaz ve likenaz enzim genleri pUB110 plazmid vektörüyle 244M1 ve 246M4 mutantlarına transforme etmeye çalışmış fakat transformasyonu gerçekleştirememiştir.

Reddi Pradeep ve ark. (2012), *Aspergillus niger* fungal suşunu EtBr ile mutasyona oğratarak selülaz aktvitesinde yükselmeyi sağlamışlardır. Mutasyondan sonra 10 mutant suşunu ($GNEB_1$ to $GNEB_{10}$) seçerek enzim aktiviteleri üzerinde çalışmışlardır. Bu suşların içinde 5 tanesi ($GNEB_1$, $GNEB_4$, $GNEB_5$, $GNEB_8$, $GNEB_9$) yabani tipe göre enzim üretimleri daha yüksek olduklarını bildirmişlerdır.

Raju ve ark. (2012), *Aspergillus niger* suşunu UV radyasonu, Ethyl Methyl Sulphonate (EMS) ve Ethidium bromide ile muamele etmişler. Mutant suşların

enzim aktivitelerin spektofotometrede DNS reagenti kullanarak belirlemişlerdir. UV-18 mutant suşu 18.11 U/ml/dk, EMS-4 mutant 14.93 U/ml/dk, Ethidiumbromide-13 mutant 18.31U/ml/min ve EMS&EB-18 mutant 18.84 U/ml/min glucoamylaz ürettiklerini ve yabani suşa göre 2-4 kat daha fazla glucoamylaz ürettiklerini bildirmişlerdir.

Walid ve ark. (2007), ultraviyole-ışınlama (UV), etil metan sülfonat (EMS) ve akridin oranj (AO) kullanarak *Aspergillus niger* UMIP 2564'ü mutasyona uğratıp ve sitrik asit üretiminin artırlmasına çalışmışlardır. Elde edilen 15 mutant suşun arasından, sekiz mutant suşun sitrik sükroz olan ortamda asit üretimlerinde artışın olduğu bildirmişlerdir. W5 (UV) mutant suşu ebeveyn yabani suşa göre yaklaşık 3.2 kat daha fazla ürün verdiğini bildirmişlerdir.

Mohamed ve ark., (2011), topraklı ortamlardan *Streptomyces pseudogriseolus* izole etmişler. İzole etdikleri izolatları UV radyasonu farklı dönemlerde ugulayarak 139 tane mutant suşu elde etmişlerdir. Bu mutant suşların içinden ki renkli, üreme ve şekilleri normal olmayan 29 tanesi morfologik mutant suş seçmişlerdir. Sonra LB-ksilan agar besi yerinde 30°C'de üç gün üretmişler ve kongo kırmızısı ile boyadıktan sonra 94 mutant suşun yabani tipe göre daha geniş zona sahip olduklarını belirtmişlerdir. Sayısal olarak 16 tane mutant suşun yabani tipe göre ksilanaz aktiviteleri yüksek olduğunu bildirmişlerdir. En yüksek ksilanaz aktivitesinin ise 121 numaralı mutant suşuna (%161 artış yabani tipe göre) ait olduğunu bildirmişledir.

Yamashiro ve ark., (2010), *Bacillus circulans'ın* β-amilaz aktivitesinin iyileştirmesini ancestral mutasyon yöntemi ile başarmışlardır.

Demirkan (2011), çeşitli karbon ve azot kaynaklarının *Bacillus subtilis* ve mutant türevlerinin α-amilaz üretimilerinin üzerine etkilerini incelemiştir. Maximum α-amilaz üretimi tüm suşlarda, karbon kaynağı olan mesoinositol ortamda olduğunu belirlemiştir. Ayrıca azot kaynaklarının takviyesi ile söz konusu enzim verimlerinde anlamlı bir artış belirlenmediğini bildirmiştir. *B. subtilis* ve mutantlarını (EBUE 5-3) saflaştırmış ve karakterize etmiştir. Amilazların saflaştırılmasında optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 45 ° C ve 6.0 olarak tespit etmiştir. Mutant suşuları alkalin koşullarda, ebeveyn suşuna göre (1 saat için pH 8.0 değerindeki yaklaşık %85), daha yüksek stabiliteye sahip olduklarını ortaya koymuştur. Amilazların Km ve Vmax

değerleri karşılaştırmıştır. Enzimler Ca^{2+} Ba^{2+} Mg^{2+} LI^{2+} ve Mn^{2+} dışında Cu^{2}+, Hg^{2+} ve AG^{2+} tarafından yüksek oranda inhibe edildiğini belirlemiştir. 1 mM metal iyonu konsantrasyonun enzim aktiviteleri üzerinde, 5 mM dan daha çok etkin olduğunu belirlemiştir. Enzimlerin, moleküler ağırlıklarını 56 kDa olarak bildirmiştir. Ebeveyn ve mutant suş tarafından üretilen amilazların N-terminal amino asit dizilerinin homolojisini bildirmiştir.

Vu ve ark., (2009), *Aspergillus* sp olarak 320 adet mantar izolatı içerisinden selülaz üretimi en yüksek olanı seçmişlerdir. Daha sonra selülaz üretiminin artırılması için UV ile γ-irradiation of Co60 iki uygulama ve N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine ile dört tekrar uygulama yapmışlardır. Görüntü analizinden sonra mutant suşlardan en iyisi olan *Aspergillus* sp. XTG-4 seçmiş, ve CMCaz aktivitesi, filtreli selülaz kağıdı ve selülazın β-glukosidasezı yabani tip suşa kıyasla sırasıyla 2.03-, 3.20-, and 1.80 kat geliştirmişlerdir. 19 kez besi ortamında bulundurulduktan sonra mutant *Aspergillus* sp. XTG-4s enzim üretiminin stabil kaldığını bildirmişlerdir.

HAQ ve ark., (2010), araştırıcılar *Bacillus amyloliquefaciens* UNG-16 suşun alfa amilaz üretiminin artırlmasına çalışmışlardır. Bakteri kültürü 15-60 dakika süreyle 1.6 × 102 J/m2/S de UV radyasyona maruz bırakmışlardır. Ancak, UV ile indüklenen alfa amilaz üretimini geliştirememişler; bu yüzden kimyasal mutajen etil metan sülfonata (EMS 50-300 ul/ml) 10-60 dakika boyunca tabi tutmuşlardır. Mutant *B. amyloliquefaciens* EMS-6 da 102,78 ± 2.22 U/ml/dak enzim aktivitesi belirlemişler, bunun ebeveyn suşun 1.4 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Prabakaran ve ark (2009), üç tür mantar *Aspergillus fumigatus, Penicillium chrysogenum ve Verticillium terrestre* şeker kamışı topraklarından izole edip UV işığı ile amilaz, selülaz ve lipaz enzimlerinin iyileştirmesine çalışmışlardır.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Zıraat Fakültesi Zootekni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuvarinde yürütülmüştür.

3. 1. Materyal

3.1.1. Aletler

Çalışmada kullanılan aletlerden santrifüj Hettich (D-78532, Tuttlingen, Almanya)' den, otoklavlar Nüve (Kumrular Sok. 26/2, Kızılay, Ankara) ve Hirayama (2-6-5 Toyono-Cho, Kasukabe-shi, Saitama 344-0014, Japonya)' dan, inkübatör Nüve (Esenboğa Yolu 22. km. Akyurt, 06287 Ankara)' den, su banyosu Memmert (Memmert GmbH + Co. KG, Äußere Rittersbacher Str. 38, 91126 Schwabach, Almanya)' den, spektroftometre Pharmacia (Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 4FJ, İngiltere)' dan, hassas terazi Ohaus (29 Hanover Road, Florham Park, NJ 07932, ABD)' dan, transillüminatör Vilber Lourmat (B.P. 66 Torcy-Z.I.SUD 77202 Marne La Vale-Codex, Fransa)' dan, vorteks ve manyetik karıştırıcı CAT (M. Zipperer GmbH, D-7813 Staufen-Etzenbach, Almanya)' den, steril kabin Bilser (İzmir)' den, çalkalayıcı Ika (Janke&Kunkel GmbH&Co KG, 79219 Staufen, Almanya)' dan, pH metre Nel (Sümer Sok., 42/1, Yenişehir, Ankara)' den, otomatik pipetler Axygen ve Brand' den temin edilmiş olup tamamı Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuarları'nda mevcut bulunmaktadır.

3.1.2. Bakteriler ve Besiyerleri

Bu çalışmada kullanılan halofilik, termofilik ve alkalifilik *Bacillus* sp suşları Van Gölü ve Hazer Denizi kıyılarından alınan toprak ve su numuneleri ile Çukurova Üniversitesi kampüsünden alınan toprak numunesi bakteri izolasyonu amacıyla kullanılmıştır. Bakteriler 55^{o}C' ye ayarlanmış inkübatörde LB sıvı besiyeri (%1

tryprone, %0.5 yeast extract, %0.5 NaCl, pH 9) ve LB-Agar (%1.5 agar) besiyerlerinde üremeleri sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan besiyerleri EK-1' de verilmiştir.

3.1.3. Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Denemelerde kullanılan kimyasal malzemeler Sigma, Merck, İontek gibi firmalardan temin edilmiş olup, Ç. Ü. Z. F. Zootekni Bölümündeki Hayvansal Bioteknoloji ve Genetik Mühendisliği labaratuvarlarında bulunar.

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve protokolleri EK-2' de verilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Örneklerden *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu

Van Gölü, Hazer Denizi ve Çukurova Üniversitesi kampüsündan toprak örnekleri alınmış ve bu örneklerden 0.5 g tartılarak 4.5 ml steril distile su ile süspansiyon haline getirilmiştir. Daha sonra bu süspansiyon 80ºC' de 10 dakika inkübe edilmiştir (Lennete ve ark. 1985). Pastörizasyondan sonra örneklerden 1'er ml alınarak sporlarının çimlenmesi amacıyla LB sıvı besiyerlerine aktarılmış ve 55°C'de gece boyunca çalkalama yöntemiyle inkübe edilmiştir (Şekil 3.1.). *Bacillus* kolonilerini elde etmek amacıylabakteri gelişmiş olan her bir sıvı besiyerinden seri sulandırmalar yapılarak uygun besiyerlerine yayma şeklinde ekimleri yapılmış, daha sonra da uygun sıcaklık koşullarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri üzerinde gelişen farklı morfolojik görünüşe sahip koloniler seçilerek alınmış ve enzim aktivitelerini belirlemek amacıyla uygun substrat içeren besiyerlerine ekimleri yapılmıştır.



Şekil 3.1. LB (Luria-Bertani) besi yerlerinde bakteri kültürlerinin üretilmesi

3.2.2. İzolatların Tür Analizi

İzoltların tür analizi aşağıda verilen işlemleri kapsayancak şekilde, İontek (İstanbul) firmasınca hizmet alımı ile yapılmıştır.

Örnekler ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazı ile ABI PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit kullanılarak dizilenmiştir. Benzerlik araştırması (GenBank/EMBL/DDBJ) Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) programı (Zhang ve ark, 2000) kullanılarak ve referans veritabanları kullanılarak yapılmıştır.

3.2.3. Bakterilerde α-Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

α-Amilaz aktivitesi bakımından test edilecek bakteriler önce LB sıvı besiyerinde uygun sıcaklıkta bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, üreyen bakterilerden steril öze yardımıyla %0.5 w/v nişasta içeren LB/Nişasta/Agar katı besiyerine çizme yöntemiyle ekimleri yapılmış ve yine bir gece inkübasyona bırakılarak koloni oluşturmaları sağlanmıştır. Bakteri kolonileri geliştikten sonra plak iyot (Merck, 053-001-00-3) buharıyla boyanarak fenotipik tayinleri yapılmıştır. Bunun için petri kapağına iyot kristalleri ezilerek konulmuş ve bakteri plağı ters çevrilerek kısa bir süre (1-2 dak.) oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Buharlaşan iyot

buharı nişastalı zemini maviye boyayacağından, maviye boyanmış zeminde etrafında beyazımsı halka oluşan koloniler α-amilaz pozitif bakteriler olarak belirlenmiştir.

3.2.4. Bakterilerde CMCaz, Ksilanaz ve Likenaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzolatlar önce uygun sıcaklıkta bir gece LB sıvı besiyerinde üretilmiştir. Ertesi gün, üreyen bakterilerden steril öze yardımıyla; CMCaz tayini için %0.1 w/v CMC (Karboksimetil selüloz, Sigma, C-5678), ksilanaz tayini için %0.1 w/v ksilan (Sigma, X-0627) ve likenaz tayini için ise %0.1 w/v likenan (Sigma) içeren LB/Agar besiyerlerine çizme yöntemiyle ekimleri yapılmış ve bir gece daha inkübasyona bırakılmışlardır. Plakların Congo-red boyaması ile izolatların CMCaz, ksilanaz ve likenaz fenotipik tayinleri yapılmıştır. Bunun için bakteri plağına, yüzeyi kaplayacak miktarda %0.2 w/v Congo-red (Sigma, C6767) boyası dökülmüştür. 15 dakika inkübasyondan sonra boya uzaklaştırılarak plağın üzerine bu sefer 1M NaCl solusyonu ilave edilmiş ve 15 dakika daha beklenerek katı besiyerindeki fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Congo-red; CMC, ksilan ve likenan içeren ortamı kırmızıya boyayacağından, kırmızıya boyanan zeminde etrafında sarımtırak zon oluşan koloniler CMCaz, ksilanaz ve likenaz pozitif bakteriler olarak belirlenmiştir (Theather and Wood, 1982).

3.2.5. Mutasyon İçin Bakterilerin Seçimi

Van Gölü, Hazer Denizi ve Çukurova Üniversitesi kampüsünden alınan örneklerden izole edilen bakterilerden üç tanesi (V-41, KH-13 ve CU-48) mutasyon çalışmaları için seçilmiştir (Özcan, 1996).

3.2.6. Mutasyon Yöntemi

Bu çalışmada bakteriler Ethidium bromid (EtBr) kullanılarak aşağıda verilen protokol uyarınca mutasyona uğratılmıştır (Özcan 1996).

1. Gün: Daha önce enzim karakterleri belirlenen izolatlar 25 ml'lik LB sıvı besi yerlerine ekilerek 55ºC'de üretildi.

Dilusyon Yöntemi: Koloni sayımı yapmak için bakteri kültürü uygun konsantrasyonda sulandırıldı. 10^{-2} dilüsyon (0.99 ml saf su içerisine 0.01 ml bakteri kültürün pipet araclığıyla konulması) şeklinde hazırlanan konsantrasyon bu şekilde azaltılan sıvı kültür steril cam çubukla LB-agar plaklarına yayıldı. 55˚C'de gece boyu inkübe edilerek tek tek seçilebilecek koloniler oluşması sağlandı.

2. Gün: Bir gece inkübe edilen bakteri kültürü katı LB besi yerinde steril cam çubuk ile yayma şeklinde ekildi. Önceden işaretlenen noktalara 20 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan Ethidium bromid pipet yardımıyla damlatıldı. Plakların yüzeyi siteril şartlarda (steril kabin) 15-20 dakika kurutuldu ve plaklar 55ºC'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

3. Gün: İnkübasyon sonucu hiç bir bakteri üremesinin gözlenmediği toksik zonun (Ethidium bromid damlatılan bölge) kıyısından steril kürdan yardımıyla koloni toplanadı ve katı LB besi yerine ekildi. Bakteriler 55ºC'de bir gece üremeye bırakıldı. Bu bakteriler nişasta ve CMC içeren besiyerlerinde enzim aktevitesinin tayini için ekilerek 55ºC'de gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda gelişen bakterilerin enzimatik karekterlerini tayini α-amilaz aktivitesi için iyodin ile (Cornelis ve ark., 1982) ve CMCaz aktivitesi için Congo-red boyaması ile (Teather ve Wood, 1982) belirlendi. Mutant bakterilerin etrafındaki zon büyüklüğü mutant olmayan varyetelerin büyüklükleri ile karşılaştırıldı. Her mutant varyete 5 tekrar da zonları ölçülmüş ve ortalamaları alınmıştır.

3.2.7. Kültür Stoklarının Hazırlanması

Her bir izolat ve bu izolatlardan elde edilen mutant varyeteleri %10 v/v gliserol içeren sıvı LB ortamında -20˚C'de muhafaza edilmiştir. Yine her bakteriden günlük kullanım amacıyla LB-Agar plaklarına ekilmeleri yapılarak master plakları oluşturulmuştur.

3.2.8. Antibiyogram Analizi

Gece buyunca sıvı besi yerinde üreyen izolatlar ile mutant varyeteleri ayrı ayrı olacak şekilde LB/Agar plaklarına cam çubukla yayılarak ekilmiştir. Ekimi tamamlanan plaklarda, besiyerlerinin üzerine birbirlerine uygun mesafelerde (minimum 1.5 cm) antibiyotik diskleri (Penisilin, Gentamisin, Streptomisin ve Kloramfenikol) yerleştirilmiştir. Kuruması için plaklar yaklaşık 10 dakika kapakları açık bir şekilde bekletilmiş, sonrasında ise kapakları kapatılarak uygun sıcaklık koşullarına ayarlanmış inkübatöre 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, bakterilerin antibiyotik disklerinin etrafındaki üreme pozisyonlarına göre dirençli/hassas şeklinde tanımlanmıştır (antibiyotik diskinin etrafında üreme varsa dirençli, antibiyotiğin yayıldığı belli bir alanda üreme yoksa hassas).

3.2.9. İzolatların ve Mutant Varyetelerinin SDS-PAGE ve Zymogram Analizleri

3.2.9. 1. Hücredışı Proteinlerin TCA Muamelesi İle Elde Edilmesi

Bakterilerden hücredışı proteinler Ek 2.9.' de verilen protokole göre TCA muamelesi ile elde edilmiştir. Protein örnekleri üzerine hacmin yarısı kadar kaynatma solüsyonu (Ek. 2.11.) ilave edilerek SDS-PAGE' de elektroforez için hazır hale getirilmiştir.

3.2.9.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (PAGE) Toplam Proteinlerin Karşılaştırılması

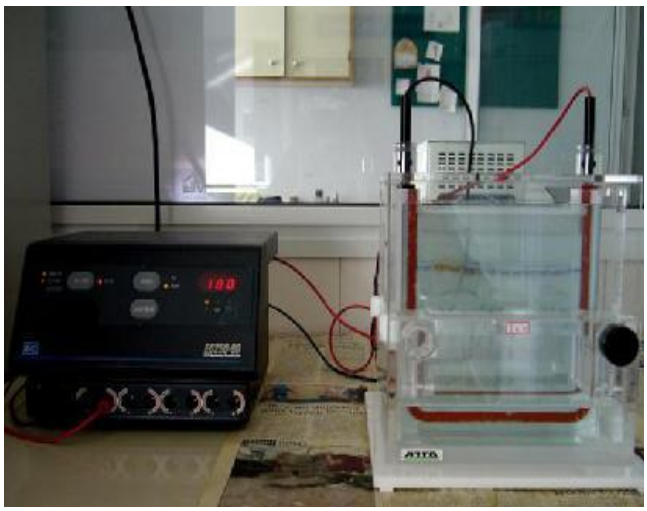
Bakterilere ait toplam proteinlerin karşılaştırılmasın da SDS-PAGE jel sisteminden yararlanılmıştır (Laemmli, 1970).

3.2.9.2.(1). SDS-PAGE Sisteminin Hazırlanması

SDS-PAGE yoğunlukları farklı olan iki ayrı katmandan meydana gelmektedir. Üstteki katman (toplayıcı jel) proteinlerin bir araya gelerek ayırıcı jele beraber girmelerini sağlamaktadır. Ayırıcı jel ise toplayıcı jele göre daha yoğun olup proteinlerin moleküler ağırlığına göre birbirinden ayrılarak bantlar oluşturduğu katmandır. %12' lik SDS-PAGE' nin hazırlanışı Ek 3.1.' de verilmiştir.

3.2.9.2.(2). Elektroforez Aletinin Çalıştırılması

Protein örnekleri SDS-PAGE kuyularına bir otomatik pipet yardımıyla konularak elektroforez tankının kapağı kapatılmış ve birer uçları güç kaynağına bağlı olan kabloların diğer uçları da elektroforez tankına bağlanmıştır. Güç kaynağı, proteinler toplayıcı jelde ilerlerken 25 mA ve 100 V' da, ayırıcı jelde ilerlerken 40 mA ve 100 V' da çalıştırılmıştır. Çift jel kullanıldığı durumda ise toplayıcı jelde 40 mA ve 100 V, ayrıcı jelde ise 60 mA ve 100 V'da çalıştırılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. İzolatlara ve mutantlarına ait hücre dışı proteinlerin elektroforez işlemine tabi tutulması

3.2.9.2.(3). SDS-PAGE Jelinin Boyanması

Elektroforezden sonra jel, cam plakalar arasından çıkarılarak Boyama solüsyonuna (Ek 2.10.9.) konulur. Yaklaşık 12 saat boyunca boyama solüsyonu içinde bırakıldıktan sonra birkaç kez saf sudan geçirilir ve jele bağlanmış fazla boyanın uzaklaştırılması için bir gece yıkama çözeltisinde (Ek 2.10.10.) inkübasyon gerçekleştirilir. Protein örneklerine bağlanan boya jelden çıkmadığı halde jelin diğer bölgelerindeki boya ortamdan uzaklaşır ve örnekler görünür hale gelirler.

3.2.9.2.(4). İzolatların ve Mutant Varyetelerinin SDS-Nişasta-PAGE' de Karşılaştırılması

Protein örnekleri %12' lik SDS-Nişasta-PAGE (%0.2 w/v nişasta) jele yüklenerek proteinlerin jel içerisinde ilerlemesi sağlanmıştır. Proteinlerin jel içerisinde ilerlemesi tamamlandıktan sonra jel Ek 3.3.' de verilen protokole göre muamele edilerek α-amilaz enziminden sorumlu bant ortaya çıkarılmıştır.

3.2.10. Enzimlerin Spesifik Aktiviteleri

Enzimlerin spesifik aktiviteleri (Lowry ve ark., 1951) yöntemine göre yapılmıştır (Ek 3.4.).

3.2.11. İzolatlara ve Mutant Varyetelere Ait Enzim Aktiviteleri

İzolatlara ve mutant varyetelerin enzim analizleri Ek. 3.5'de verilmiştir.

3.2.11.1. Bakterilerin Zamana Göre Enzim Aktiviteleri

Bakterilerin üreme periyotlarına göre enzim aktivite seviyelerinin belirlenmesi amacı ile yapılmıştır (Ek 3.6.).

3.2.11.2. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimleri optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi amacı ile 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C' lik sıcaklık değerlerinde reaksiyonlar kurulmuştur. Reaksiyonlar Ek 3.5'de verilen protokol uyarınca yapılmıştır. En yüksek absorbans değeri enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerini vermiştir.

3.2.11.3. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Belirlenmesi

Enzimlerin optimum aktivite gösterdiği pH değerleri Ek 3.7'da verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Bacillus* sp. V-41 İzolatına Ait Bulgular

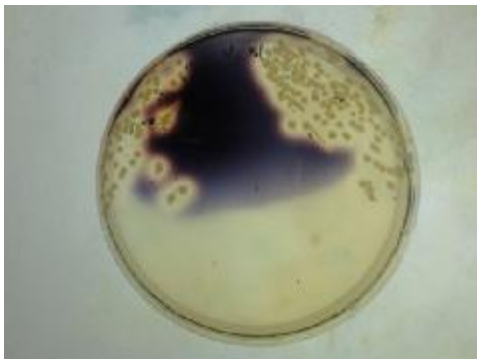
4.1.1. *Bacillus* sp. V-41'e Ait Enzimatik Aktiviteler

Van Gölü'den alınan toprak ve su numunelerinden izole edilen *Bacillus* sp. V-41 izolatına ait α-amilaz, CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimlerine ait aktivite durumları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Bacillus* sp. V-41 izolatına ait bazı enzimlerin aktivite durumu.

İzolat	Enzim karakteristikleri			
	α-Amilaz	CMCaz	Ksilanaz	Likenaz
Bacillus sp. V-41	+	-	-	-

Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere *Bacillus* sp. V-41 izolatı sadece α-amilaz enzimi bakımından pozitif bulunurken, CMCaz, ksilanaz ve likenaz bakımından negatif bulunmuştur. Bakteriye ait α-amilaz aktivite zonları LB-Nişasta-Agar besiyerinde iyot boyaması ile gösterilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. *Bacillus* sp. V-41 izolatının LB-Nişasta-Agarda iyot boyaması sonucu görüntüsü (α-amilaz^{+}).

4.1.2. *Bacillus* sp. V-41 İzolatının Tür Analizi

Bacillus sp. V-41 izolatının 16S rRNA dizi analizi sonucu elde edilen sekans aşağıdaki gibi bulunmuştur.

>250565-M4-153224 sequence exported from V-41-518F1.ab1

GGATCATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAGTCTGATGTGAATCTCTGCGGCTCA
CCGTAAGCGGTCATTGGAACTGGGGGACTCTGAGTGCAGGAGAGGAAGCGGAATTCCATGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGCCT
GTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCGTGGT

Bu dizinin BLAST programı (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) kullanılarak elde edilen sonuçlarına göre, V-41 izolatının 16S ribozomal RNA geni sekansının, kültüre alınmamış bir bakteri olan HAV7D9G02CMKTO'ın 16S ribozomal RNA geni sekansı ile 8 nükleotitlik farklılıkla, iki genin sekansının %97 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. V-41 izolatının Uncultured bacterium clone HAV7D9G02CMKTO 16S ribosomal RNA gene, partial sequence ile16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

```
V-41 3    ATCATTGGGCGT-AAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTT-AGTCTGATGTG-AATCTCTGCGGC  59
          |||||||||||| |||||||||||||||||||||| |||||||||| ||||| ||||||
Ref  25   ATCATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAATCT-TGCGGC  83

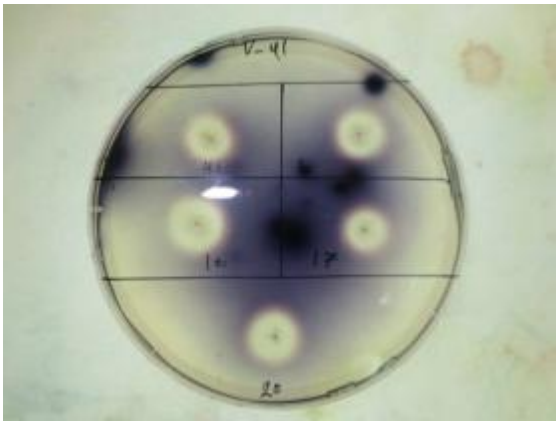
V-41 60   TC-ACCGTAAGCGGTCATTGG-AACTGGGGGACTCTGAGTGCAGGAGAGG-AAGCGGAAT  116
          || |||||||||||||||||| |||||||||||| ||||||||||||||| |||||||||
Ref  84   TCAACCGTAAGCGGTCATTGGAAACTGGGGGACT-TGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAAT  142

V-41 117  TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTT  176
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref  143  TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTT  202

V-41 177  TCTGGCCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  228
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref  203  TCTGGCCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  254
```

4.1.3. *Bacillus* sp. V-41 Üzerine Yapılan Mutasyon Çalışmaları

Bacillus sp. V-41 izolatının EtBr ile muamele edilmesi sonucu 4 adet mutant bakteri (V41-M1, V41-M2, V41-M3 ve V41-M4) elde edilmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *Bacillus* sp. V-41 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin LB-Nişasta-Agarda iyot boyaması ile karşılaştırılması.

Bu mutant varyeteler (V41-M1, V41-M2, V41-M3 ve V41-M4) aktivite zon çapları gözönünde bulundurularak seçilmişlerdir. Her varyetenin 5'er tekrar zonlarının çapları ölçülmüştür. Normal bakteri ile mutantlarına ait çap ortalamaları sırasıyla 28.8, 31.4, 30.4, 28.4 ve 33.2 olarak bulunmuştur.

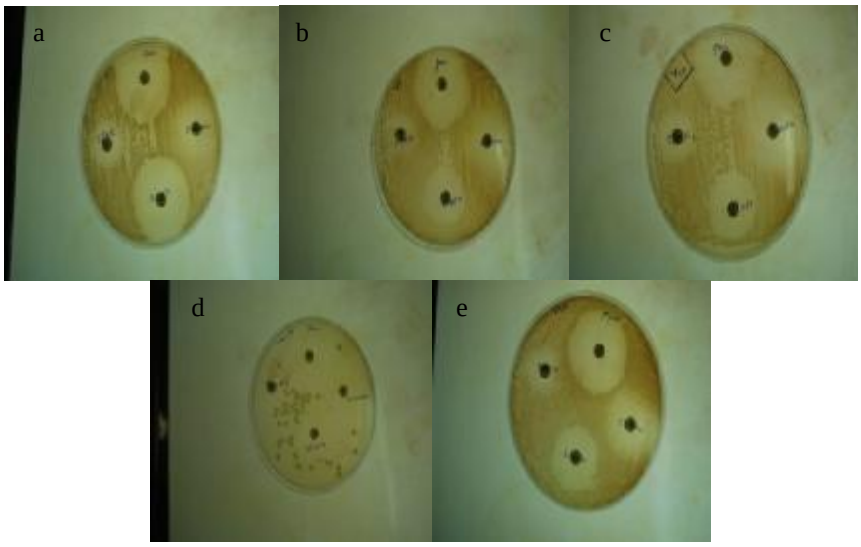
4.1.4. *Bacillus* sp. V-41 ve Mutantlarının Antibiyogram Analizi

Bacillus sp. V-41 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyeteler antibiyogram testi yapılmıştır. V-41 ile mutant varyetelerin antibiyogram sonuçları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. *Bacillus* sp. V-41 ile mutant bakterilerin antibiyogram sonuçları

Bakteri suşu	Penisilin	Gentamisin	Streptomisin	Kloramfenikol
Bacillus sp. V-41	−	−	−	−
Bacillus sp. V41-M1	−	−	−	−
Bacillus sp. V41-M2	−	−	−	−
Bacillus sp. V41-M3	−	−	−	−
Bacillus sp. V41-M4	−	−	−	−

(+): antibiyotiğe dirençli, (-): antibiyotiğe hassas.

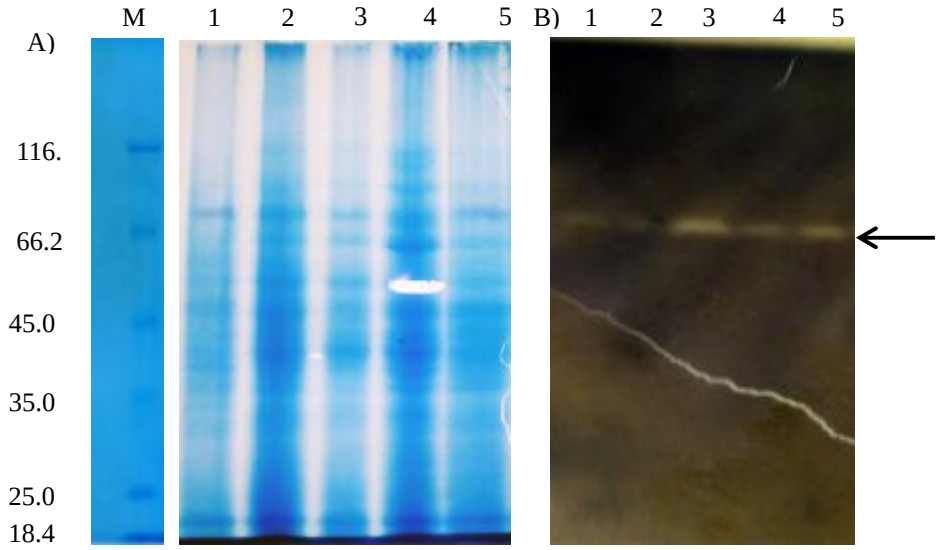


Şekil 4.3. *Bacillus* sp. V-41 ile mutantlarına ait antibiyogram test plaklarının görüntüsü: a) V-41, b) V41-M1, c) V41-M2, d) V41-M3, e) V41-M4.

4.1.5. V-41 İle Mutantlarının SDS-PAGE ve SDS-NİŞASTA-PAGE'de Analizleri

Bacillus sp. V-41 ile mutant varyeteleri SDS-PAGE'de toplam proteinleri bakımından karşılaştırılmıştır. İzolat ile mutantlarının toplam bant profilleri birbirleri ile uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.4a)

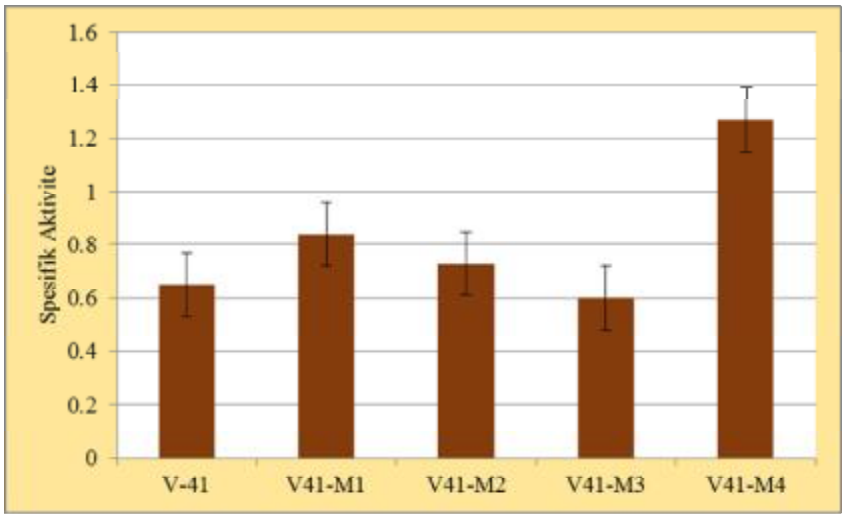
Bacillus sp. V-41 izolatı ile mutant varyetelerine ait α-amilaz enziminden sorumlu aktivite bantları SDS-Nişasta-PAGE'de karşılaştırılmış ve bütün bakterilere ait yaklaşık 70 kDa ağırlığında tek bir bant gözlenmiştir (Şekil 4.4b).



Şekil 4.4. *Bacillus* sp. V-41 izolatı ve mutant varyetelerine ait toplam proteinlerinin SDS-PAGE'de (A), α-Amilaz aktivitelerinin ise SDS-Nişasta-PAGE'de (B) karşılaştırılması. (M: marker, 1: V-41, 2: V41-M1, 3: V41-M2, 4: V41-M3, 5: V41-M4).

4.1.6. *Bacillus* sp. V-41 İzolatı İle Bu İzolattan Elde Edilen Mutant Varyetelerin Spesifik Aktiviteleri

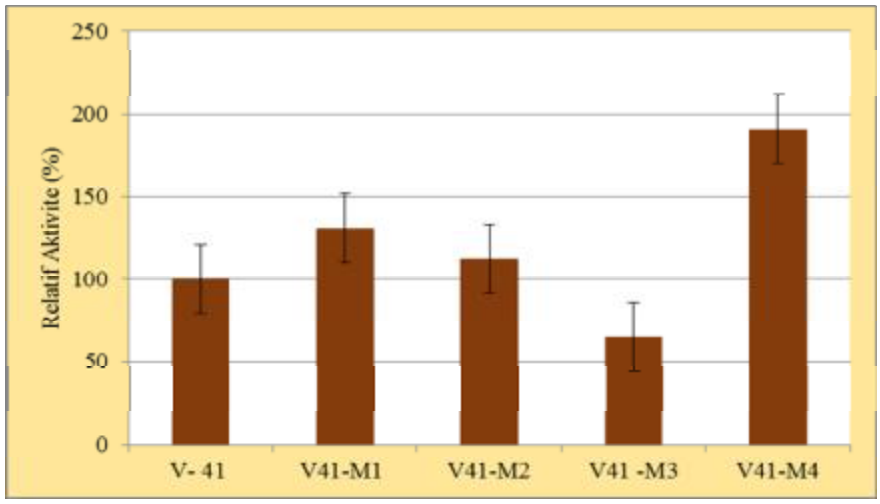
Bacillus sp. V-41 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelere ait proteinler Lowry (1951) yöntemine göre analiz edilerek her bir suşa ait 1 mg proteinin 1 dakikada ne kadar substratı parçaladığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre V-41 izolatı α-amilaz bakımından 0.65 nmol/dk/mg protein değerine sahipken V41-M1, V41-M2, V41-M3 ve V41-M4 mutantları sırasıyla 0.84, 0.73, 0.6 ve 1.27 nmol/dk/mg protein değerine sahip olmuşlardır (Şekil 4. 5.).



Şekil 4.5 *Bacillus* sp. V-41 izolatı ile elde edilen mutant varyetelerin α-Amilaz üretimi bakımından spesifik aktivitelerinin karşılaştırılması.

4.1.7. *Bacillus* sp. V-41 İzolatı İle Bu İzolattan Elde Edilen Mutant Varyetelerin Enzim Aktiviteleri Bakımından Karşılaştırılması

Bacillus sp. V-41 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyeteleri enzim üretimi bakımından karşılaştırıldığında; V41-M3 mutantının enzim üretiminin *Bacillus* sp. V-41 izolatına göre %35.46 oranında azaldığı, buna karşın V41-M1, V41-M2 ve V41-M4 mutantlarında ise enzim üretimin sırasıyla %30.90, %12.73 ve %90.90 oranlarında arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.6.).

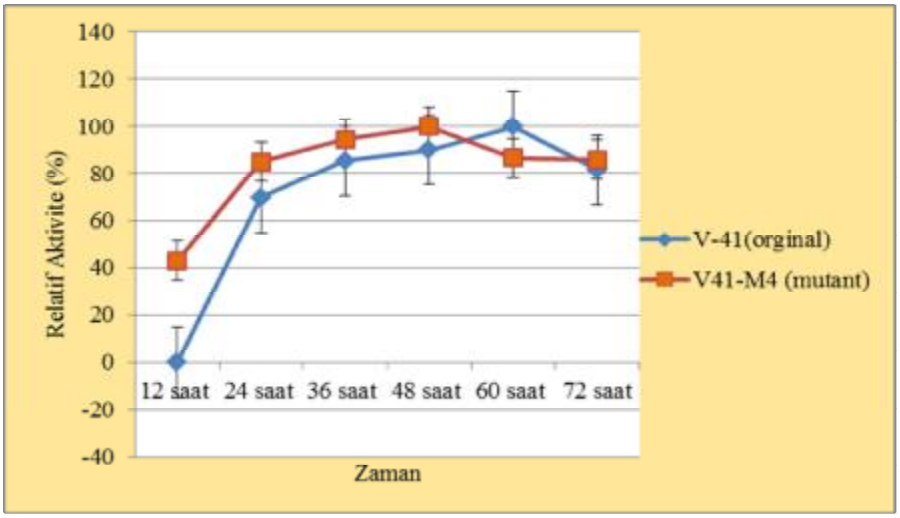


Şekil 4.6. *Bacillus* sp. V-41 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerinin α-Amilaz üretimi bakımından karşılaştırılması.

V-41 izolatı ile Bu izolatından elde edilen mutant varyetelerin içinden en yüksek enzim aktiviteye sahip mutant varyete seçilip enzim analizleri yapılmıştır.

4.1.8. *Bacillus* sp. V-41 İzolatın ve V41-M4 Mutant Varyetesinin Zamana Göre Amilaz Aktiviteleri

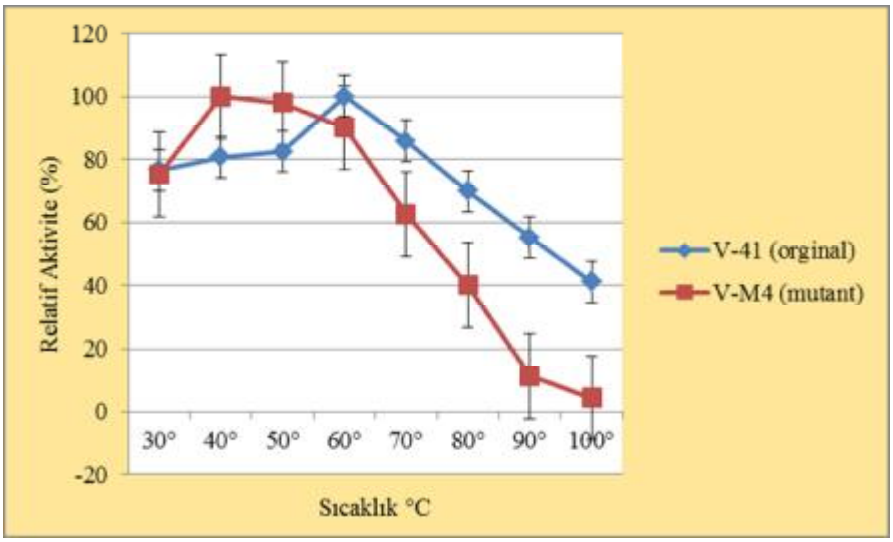
Bacillus sp. V-41 izolatı ve bu izolattan elde edilen V41-M4 mutant varyetenin amilaz üretimleri, bakterilerin üreme peryodlarının sırası ile 60 ve 48. saatinde maksimum düzeye çıkmıştır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. *Bacillus* sp. V-41 ile V41-M4 mutantının zamana göre amilaz aktivite grafiği.

4.1.9. *Bacıllus* sp. V-41 İzolatın ve V41-M4 Mutantına Ait α-Amilaz Enzimlerinin Optimum Sıcaklıkları

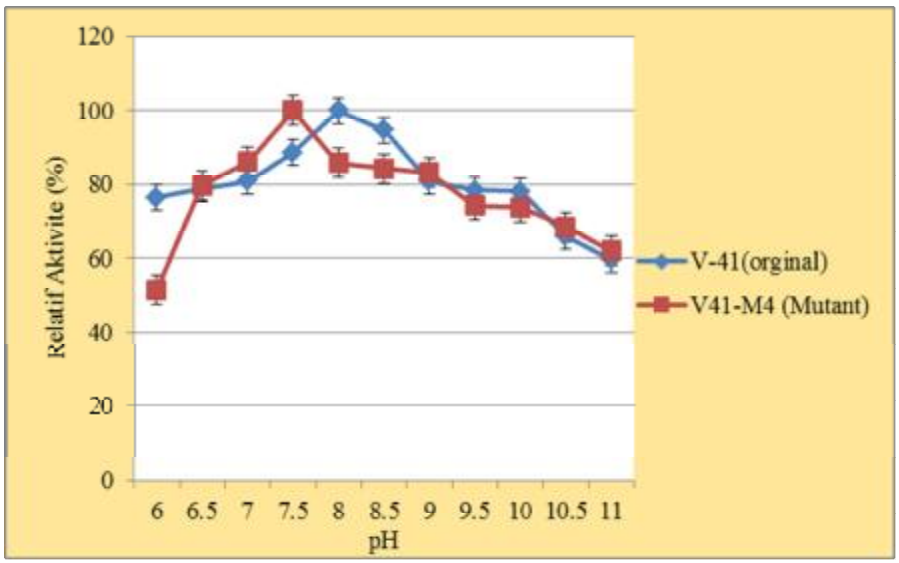
Bacillus sp. V-41 izolatı ile bu izolatdan elde edilen V41-M4 mutantına ait α-amilaz enzimlerinin optimum sıcaklıkları 40-60°C yayılmış olarakparalel seyretmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. *Bacillus* sp. V-41 ile V41-M4'üne ait α-Amilaz enzimlerinin sıcaklık optimum aktivite grafiği.

4.1.10. *Bacıllus* sp. V-41 İzolatın ve V41-M4 Mutant Varyetesine Ait α-Amilaz Enziminin Optimum pH Değerleri

Bacillus sp. V-41 izolatı ile V41-M4 mutantı tarafından üretilen α-amilaz enzimlerinin aktivite göstermek için en uygun pH değerleri araştırılmış ve enzimlerinin optimum pH değerleri 7.5-8.5 aralığında paralel seyretmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. *Bacillus* sp. V-41 izolatın ve V41-M4 mutantın farklı pH' larda α-Amilaz üretimi.

4.2. *Bacillus* sp. KH-13 İzolatına Ait Bulgular

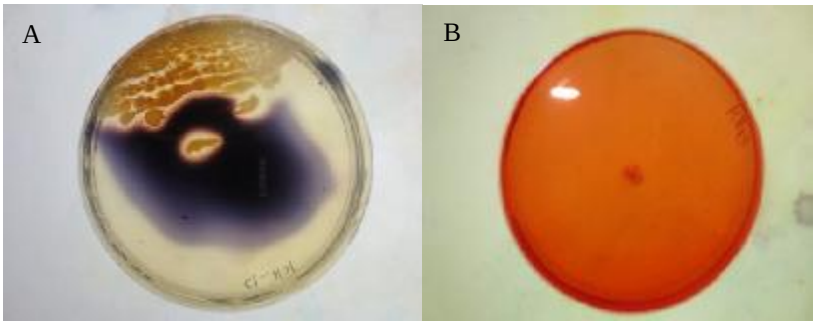
4.2.1. *Bacillus* sp. KH-13'e Ait Enzimatik Aktiviteler

Hazer Denizi kıyısından alınan toprak numunesinden izole edilen *Bacillus* sp. KH-13 izolatına ait enzimatik aktivite durumları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. *Bacillus* sp. KH-13 izolatına ait enzim aktivite durumu.

izolat	Enzim karakteristikleri			
	α-Amilaz	CMCaz	**Ksilanaz**	Likenaz
Bacillus sp. KH-13	+	-	+	-

Çizelge 4.3'de görüldüğü üzere *Bacillus* sp. KH-13 izolatı, aktivite testi yapılan α-amilaz, CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimlerinden α-amilaz ve ksilanaz bakımından pozitif bulunarken CMCaz ve likenaz bakımından negatif bulunmuştur. KH-13 izolatına ait α-amilaz ve ksilanaz aktivite zonları sırasıyla LB-Nişasta-Agar ve LB-Ksilan-agar besiyerlerinde Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. *Bacillus* sp. KH-13 izolatının LB-Nişasta-Agar (A) ve LB-Ksilan-Agarda (B) aktivite zonları.

4.2.2. *Bacillus* sp. KH-13 İzolatının Tür Analizi

Bacillus sp. KH-13 izolatının 16S rRNA dizi analizi sonucu elde edilen sekans aşağıdaki gibi bulunmuştur.

>250567-M4-153224 sequence exported from KH-13-518F.ab1

GTGTCAGGATCATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAGTCTGATGTGAAATCTTGC
GGCTCAACCGCTAAGCGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGA
ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT
TTCTGGCCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGT

Bu dizinin BLAST programı (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) kullanılarak elde edilen sonuçlarına göre, KH-13 izolatının 16S ribozomal RNA geni sekansının, *Bacillus* sp. M26' m 16S ribozomal RNA geni sekansı ile 5 nükleotitlik farklılıkla, iki genin sekansının %98 oranında benzerlik gösterdiği (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. KH-13 izolatının *Bacillus* sp. M26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence ile16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

```
KH-13 9    ATCATTGGGCGT-AAGCGCGCGCAGGCGGT-CCTTT-AGTCTGATGTGAAATCTTGCGGC  65
           |||||||||||| |||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||||||
Ref   512  ATCATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCCTTTAAGTCTGATGTGAAATCTTGCGGC  571

KH-13 66   TCAACCGCTAAGCGGTCATTGGAA-CTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAAT  124
           ||||||| ||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref   572  TCAACCG-TAAGCGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAAT  630

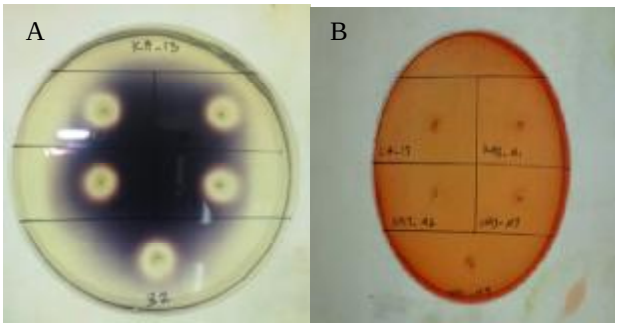
KH-13 125  TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTT  184
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref   631  TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTT  690

KH-13 185  TCTGGCCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC  244
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref   691  TCTGGCCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC  750

KH-13 245  TGGT  248
           ||||
Ref   751  TGGT  754
```

4.2.3. *Bacillus* sp. KH-13 Üzerine Yapılan Mutasyon Çalışmaları

Bacillus sp. KH-13 izolatının EtBr ile muamele edilmesi sonucu 4 adet mutant bakteri (KH13-M1, KH13-M2, KH13-M3, KH13-M4) elde edilmiştir (Şekil 4.11 A ve B.).



Şekil 4.11. *Bacillus* sp. KH-13 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin LB-Nişasta-Agar (A) ve LB-Ksilan-Agarda (B) karşılaştırılmaları.

Bu mutant varyeteler (KH13-M1, KH13-M2, KH13-M3, KH13-M4) aktivite zon çapları gözönünde bulundurularak seçilmişlerdir. Her varyetenin 5'er tekrar zonlarının çapları normal bakteri ile birlikte ölçülmüştür. Normal bakteri ile mutantlarının çap ortalamaları α-amilaz aktivitesinde sırasıyla 28.2, 27.6, 28, 28.8 ve 27.8, ksilanaz aktivitesi ise 28.2, 27.6, 31.8, 30.6 ve 32.6 olarak bulunmuştur.

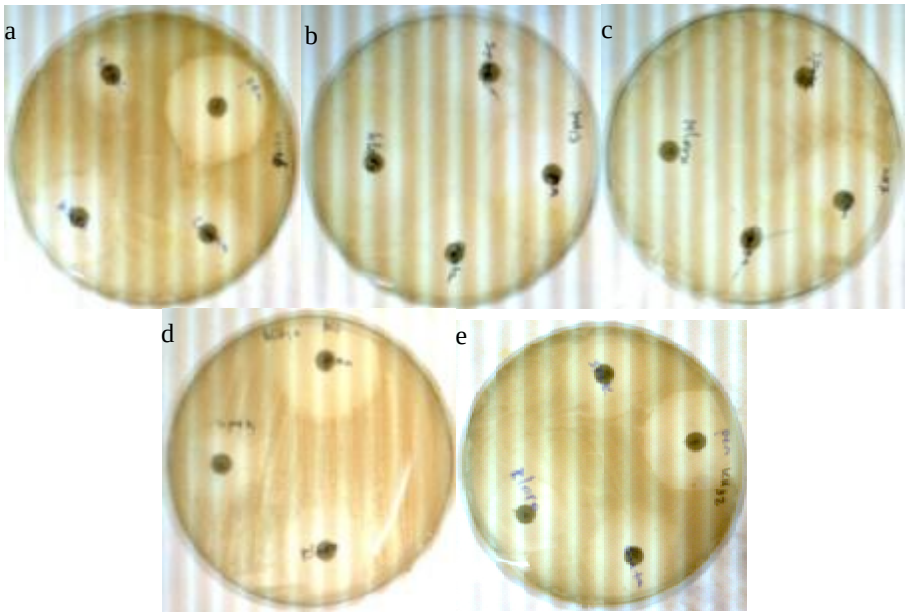
4.2.4. *Bacillus* sp. KH-13 ve Mutantlarının Antibiyogram Analizi

Bacillus sp. KH-13 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin antibiyogram testi yapılmıştır. KH-13 ile mutant varyetelerin antibiyogram sonuçları Çizelge 4.6 ve Şekil 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. *Bacillus* sp. KH-13 ve mutant varyetelerinin antibiyogram Testi

Bakteri suşu	Penisilin	Gentamisin	Streptomisin	Kloramfenikol
Bacillus sp. (KH-13)	−	−	−	−
Bacillus sp. KH13-M1	−	−	−	−
Bacillus sp. KH13-M2	−	−	−	−
Bacillus sp. KH13-M3	−	−	−	−
Bacillus sp. KH13-M4	−	−	−	−

(+): antibiyotiğe dirençli, (-): antibiyotiğe hassas.

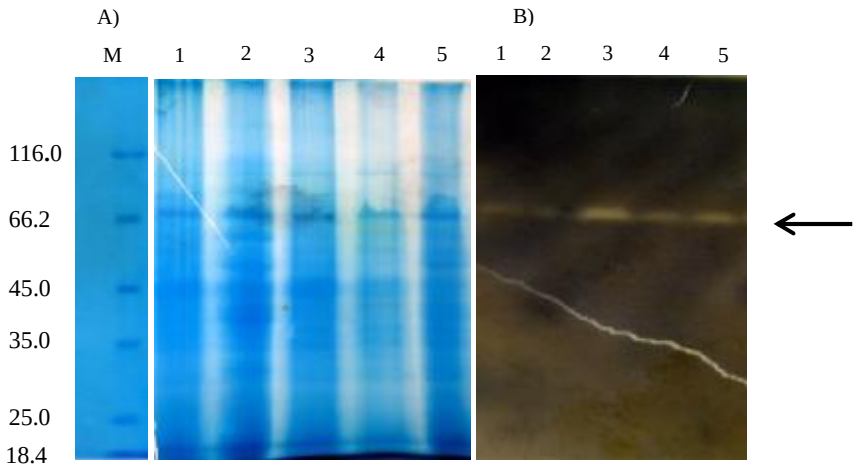


Şekil 4.12. *Bacillus* sp. KH-13 ile mutantlarına ait antibiyogram test plaklarının görüntüsü: a) KH-13, b) KH13-M1, c) KH13-M2, d) KH13-M3, e) KH13-M4.

4.2.5. KH-13 İle Mutantlarının SDS-PAGE ve SDS-NİŞASTA-PAGE'de Analizleri

Bacillus sp. KH-13 ile bu izolattan elde edilen mutant varyeteler gerek toplam proteinleri bakımından SDS-PAGE'de, gerekse α-amilaz aktiviteleri bakımından SDS-Nişasta-PAGE'de karşılaştırılmışlardır. SDS-PAGE'de toplam protein bant profilleri incelendiğinde, bantların birbirleri ile benzerlik gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.13a). Ayrıca zimogram analizlerine göre tüm bakterilerin aynı

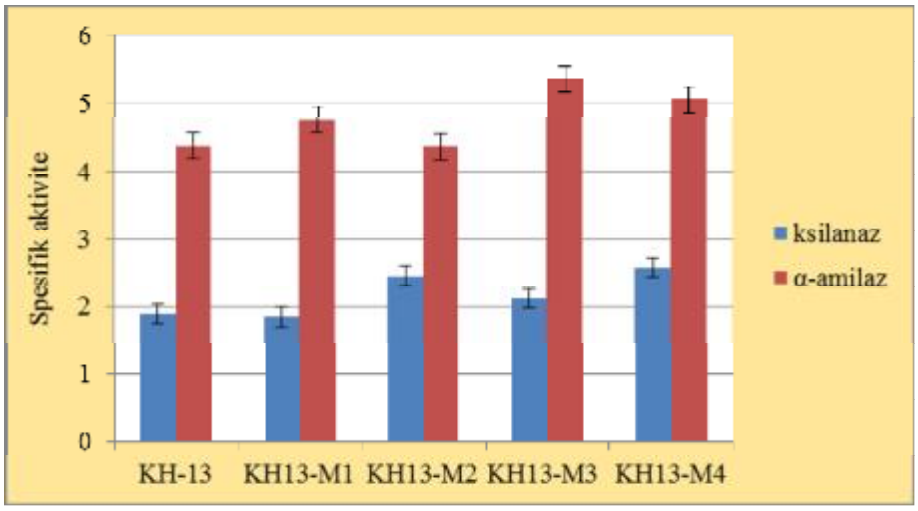
moleküler ağırlıkta (yaklaşık 66 kDa) α-amilaz bantları ürettiği gözlenmiştir (Şekil 4.13b).



Şekil 4.13. *Bacillus* sp. KH-13 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin toplam protein bakımından SDS-PAGE'de (A), α-Amilaz aktivite bantı bakımından SDS-Nişasta-PAGE'de (B) karşılaştırılması. (M: marker, 1: KH-13, 2: KH13-M1, 3: KH13-M2, 4: KH13-M3, 5: KH13-M4).

4.2.6. *Bacillus* sp. KH-13 İzolatı İle Bu İzolattan Elde Edilen Mutant Varyetelerin Spesifik Aktiviteleri

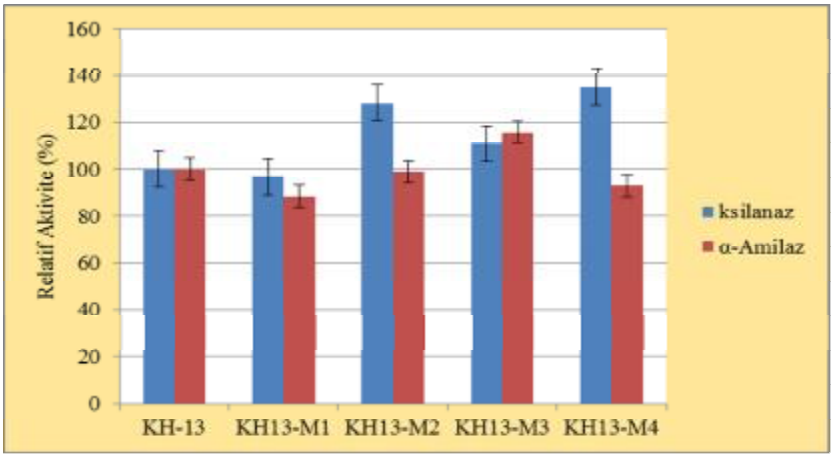
Bacillus sp. KH-13 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelere ait proteinler Lowry (1951) yöntemine göre analiz edilerek her bir suşa ait süpernatant ta 1 mg proteinin 1 dakikada ne kadar substratı parçaladığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre KH-13 izolatı α-amilaz bakımından 4.38 nmol/dk/mg protein değerine sahipken, KH13-M1, KH13-M2, KH13-M3 ve KH13-M4 mutantları sırasıyla 4.76, 4.37, 5.35 ve 5.05 nmol/dk/mg protein spesifik α-amilaz aktivitesine değerine sahip olmuşlardır. Ksilanaz enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında ise KH-13 izolatı 1.9 nmol/dk/mg protein değerine sahip olurken, KH13-M1, KH13-M2, KH13-M3 ve KH13-M4 mutantları sırasıyla 1.85, 2.45, 2.12 ve 2.58 nmol/dk/mg protein spesifik ksilanaz aktivitesine sahip olmuştur (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. *Bacillus* sp. KH-13 izolatı ile elde edilen mutant varyetelerin α-Amilaz ve ksilanaz enzimi bakımından spesfik aktiviteleri.

4.2.7. *Bacillus* sp. KH-13 İzolatı İle Bu İzolattan Elde Edilen Mutant Varyetelerin Enzim Aktiviteleri Bakımından Karşılaştırılması

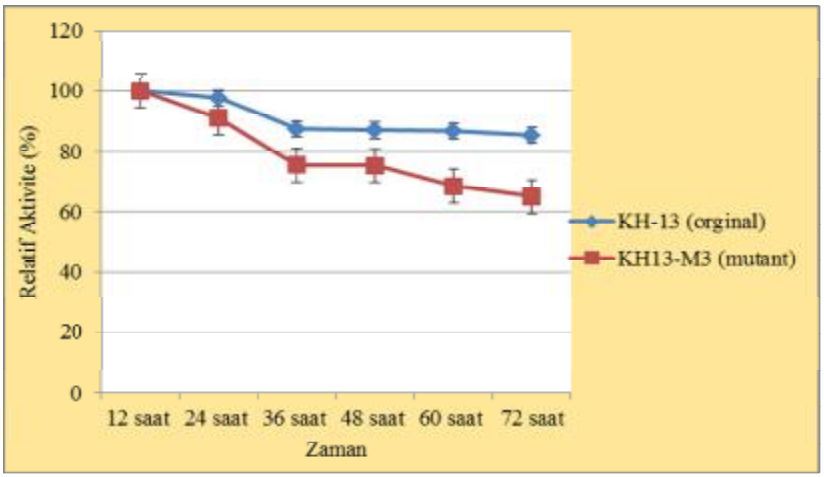
Bacillus sp. KH-13 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyeteleri α-amilaz enzim üretimi bakımından karşılaştırıldığında; KH13-M1, KH13-M2 ve KH13-M4 suşlarının α-amilaz üretimin ise sırasıyla %11.47, %1.08, ve %7.04 oranlarında azaldığı, bunlara karşın KH13-M3 izolatın enzim üretiminin KH-13'e göre %15.74 oranında arttığı gözlenmiştir. Ksilanaz enzimi aktivitesi bakımından ise KH13-M1'in %3.16 azaldığı ve KH13-M2, KH13-M3 ve KH13-M4 sırasıyla %28.42, 10.87 ve 35.08 enzim aktiviteleri arttığı görülmüştür (Şekil 4.15.).



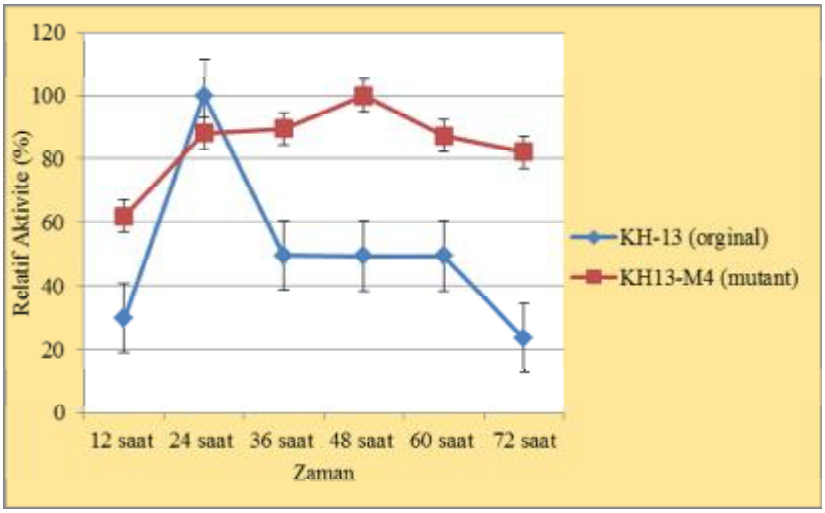
Şekil 4.15. *Bacillus* sp. KH-13 izolatı ile elde edilen mutant varyetelerin α-Amilaz ve ksilanaz enzimlerini üretimi bakımından karşılaştırılması.

4.2.8. *Bacillus* sp. KH-13 İzolatı ile KH13-M3 Mutant Varyetesinin Zamana Göre Amilaz ve Ksilanaz Aktiviteleri

Bacillus sp. KH-13 izolatın ve bu izolattan elde edilen mutant KH13-M3 varyetesinin amilaz üretimleri, bakterilerin üreme peryodlarının 12. saatlerinde maksimum düzeye çıkmışlardır (Şekil 4.16). Yine KH-13 ile KH13-M4'ün zamana göre ksilanaz üretimi karşılaştırıldığında KH-13'ün maksimum ksilanaz üretimi bakteri üreme periyodunun 24. saatinde gerçekleşirken, KH13-M4'ün maksimum ksilanaz üretimi bakteri üreme periyodunun 48. saatinde gerçekleşmiştir (Şekil 4.17.).



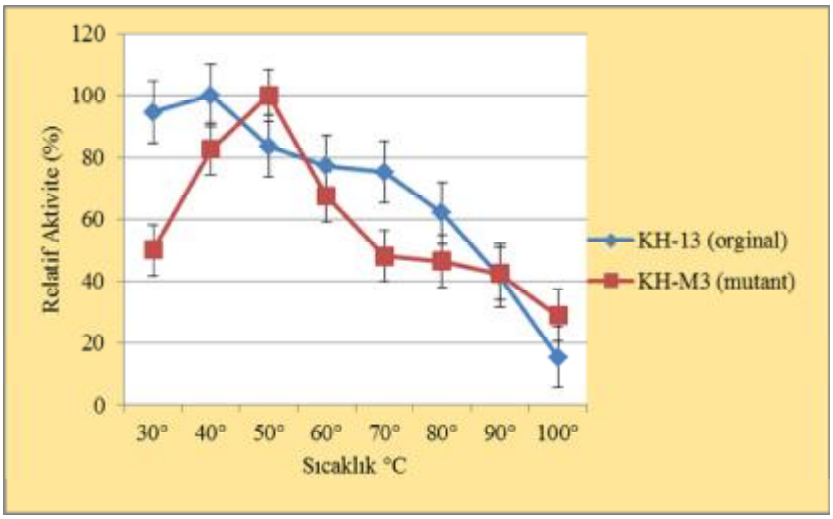
Şekil 4.16. *Bacillus* sp. KH-13 izolatı ile KH13-M3 mutant varyetesinin zamana göre α-Amilaz üretim grafiği.



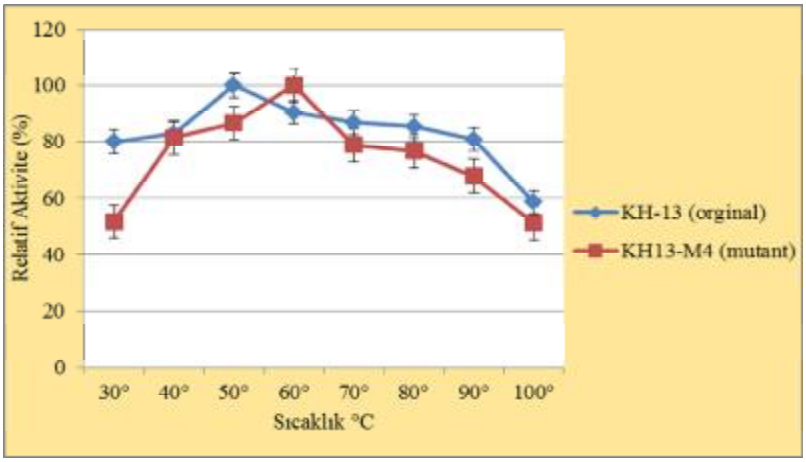
Şekil 4.17. *Bacillus* sp. KH-13 izoltı ile KH13-M4 mutant varyetesinin zamana göre ksilanaz üretim grafiği.

4.2.9. *Bacillus* sp. KH-13 İzolatı ile KH13-M3 Mutant Varyetesine Ait α-Amilaz ve Ksilanaz enzimlerinin Optimum Sıcaklıkları

Bacillus sp. KH-13 izolatı ile KH13-M3 mutantına ait α-amilaz enzimlerinin optimum sıcaklıkları sırasıyla 40 ve 50 °C olarak gerçekleşmiştir (şekil 4.18.). Her iki bakterinin ksilanaz enzimlerine ait optimum sıcaklık değerleri ise sırasıyla 50 ve 60 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.19.).



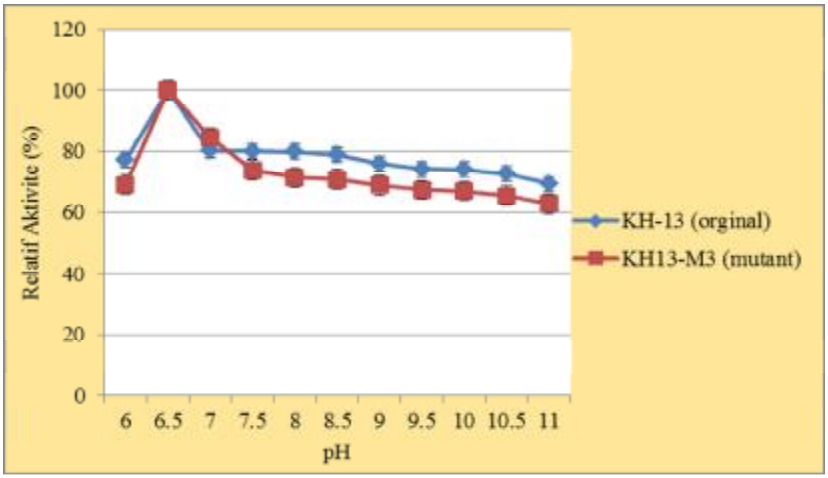
Şekil 4.18. *Bacillus* sp. KH-13 ile KH13-M3 mutantına ait α-Amilaz enzimlerinin optimum sıcaklık grafiği



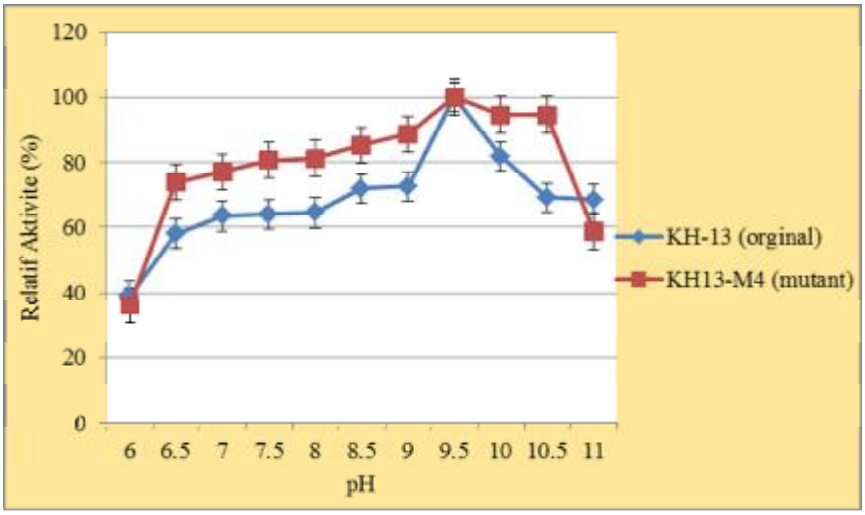
Şekil 4.19. *Bacillus* sp. KH-13 ile KH13-M4 mutantına ait ksilanaz enzimlerinin optimum sıcaklık grafiği

4.2.10. *Bacıllus* sp. KH-13 ve KH13-M3 Mutant Bakterilerine Ait α-Amilaz ve Ksilanaz Enzimlerinin pH Optimumları

Bacillus sp. KH-13 ile KH13-M3 mutantı tarafından üretilen α-amilaz ve ksilanaz enzimlerinin pH optimumları araştırılmıştır. α-amilaz için her iki bakterinin de pH özellikleri birbirleri ile benzer olup, pH optimumları 6.5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.20.). Yine her iki bakteriye ait ksilanaz enzimlerinin pH grafikleri incelendiğinde, her iki enziminde geniş bir pH aralığında aktivite gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.21.). Her iki ksilanaz enziminin de pH optimumu 9.5 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20. *Bacillus* sp. KH-13 ile KH13-M3 mutantına ait α-Amilaz enzimlerinin pH grafikleri



Şekil 4.21. *Bacillus* sp. KH-13 ile KH13-M4 mutantına ait ksilanaz enzimlerinin pH grafikleri

4.3. *Bacillus* sp CU-48 İzolatına Ait Bulgular

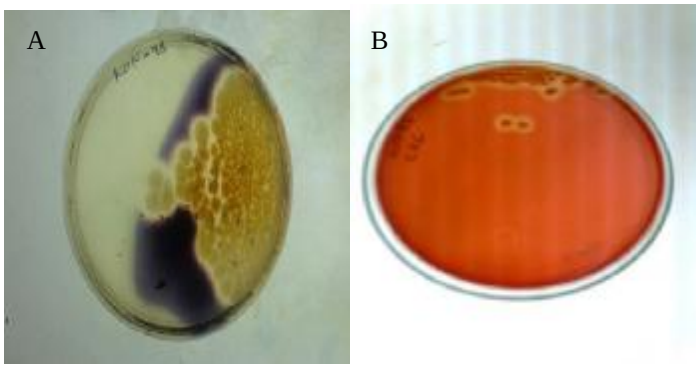
4.3.1. *Bacillus* sp. CU-48'e Ait Enzimatik Aktiviteler

Çukurova Üniversitesi kampüsünden alınan toprak numunesinden izole edilen *Bacillus* sp. CU-48 izolatına ait enzimatik aktivite durumları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. *Bacillus* sp. CU-48 izolatına ait enzim aktivite durumları

Bakteri izolatı	Enzim karakteristikleri			
	α-Amilaz	**CMCaz**	Ksilanaz	Likenaz
Bacillus sp. CU-48	+	+	-	-

Çizelge 4.7'de görüldüğü üzere *Bacillus* sp. CU-48 izolatı, aktivite testi yapılan α-amilaz, CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimlerinden α-amilaz ve CMCaz bakımından pozitif bulunarken ksilana ve likenaz bakımından negatif bulunmuştur. CU-48 izolatına ait α-amilaz ve CMCaz aktivite zonları sırasıyla LB-Nişasta-Agar ve LB-CMC-Agar besiyerinde Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. *Bacillus* sp. CU-48 izolatının LB-Nişasta-Agar (A) ve LB-CMC-Agarda (B) aktivite zonları.

4.3.2. *Bacillus* sp. CU-48 Suşunun 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları

Bacillus sp. CU-48 izolatının 16S rRNA dizi analizi sonucu elde edilen sekans aşağıdaki gibi bulunmuştur.

>250659-M4-153224 sequence exported from CU-48-518F.ab1

GTGTCGGATCATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAGTCTGATGTGAATCTTCGCG
GCTCAACCGCAAGCGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAA
TTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTT
TCTGGCCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGT

Bu dizinin BLAST programı (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) kullanılarak elde edilen sonuçlarına göre, CU-48 izolatının 16S ribozomal RNA geni sekansının, *Bacillus thermolactis* bakterisinin 16S ribozomal RNA geni sekansı ile 6 nükleotitlik farklılıkla, iki genin sekansının %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. CU-48 izolatının *Bacillus thermolactis* partial 16S rRNA gene, strain (R-6486) ile 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları.

```
İzolat: 2   TGT-CGG-ATCATTGGGCGT-AAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTT-AGTCTGATGTG-AATC  56
            ||| ||| |||||||||||| |||||||||||||||||||||| |||||||||| ||||
Ref:    536 TGTCCGGAATCATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAATC 595

İzolat: 57  TTCGCGGCTCAACCGCAAGCGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGGAAA 116
            || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref:    596 TT-GCGGCTCAACCGCAAGCGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGGAAA 654

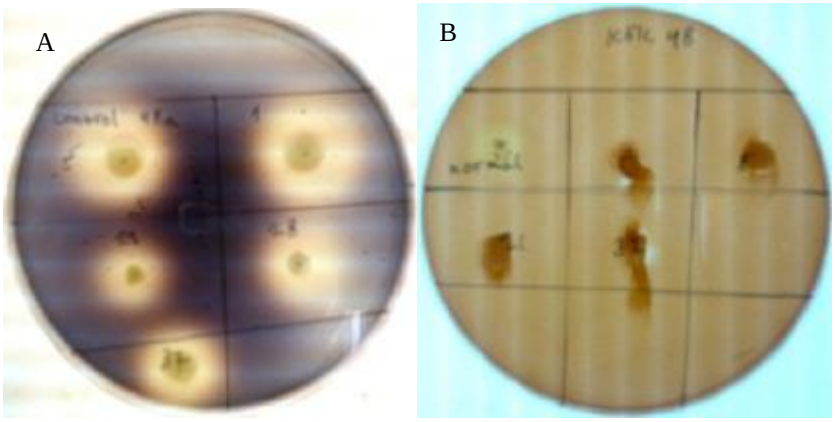
İzolat: 117 GCGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG 176
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref:    655 GCGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG 714

İzolat: 177 GCGGCTTTCTGGCCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA 236
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Ref:    715 GCGGCTTTCTGGCCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA 774

İzolat: 237 GATACCCTGGT  247
            ||||||||||
Ref:   775  GATACCCTGGT  785
```

4.3.3. *Bacillus* sp. CU-48 Üzerine Yapılan Mutasyon Çalışmaları

Bacillus sp. CU-48 izolatının EtBr ile muamele edilmesi sonucu 4 adet mutant bakteri (CU48-M1, CU48-M2, CU48-M3, CU48-M4) elde edilmiştir. Elde edilen 4 adet mutant varyete ele alınan enzimatik aktiviteler bakımından test edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre bütün mutant bakterilerde CMCaz aktivitelerinin köreldiği, buna karşın α-amilaz aktvitesini ise korudukları gözlenmiştir (Şekil 4.23 A ve B).



Şekil 4.23. *Bacillus* sp. CU-48 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin LB-Nişasta-Agar (A) ve LB-CMC-Agarda (B) karşılaştırılmaları.

Bu mutant varyeteler (CU48-M1, CU48-M2, CU48-M3, CU48-M4) aktivite zon çapları gözönünde bulundurularak seçilmişlerdir. Her varyetenin 5'er tekrar zonlarının çapları normal bakteri ile birlikte ölçülmüştür. Normal bakteri ile mutantlarının çap ortalamaları α-amilaz aktivitesinde sırasıyla 29.6, 33, 34.8, 29.2 ve 30.2 olarak bulunmuştur.

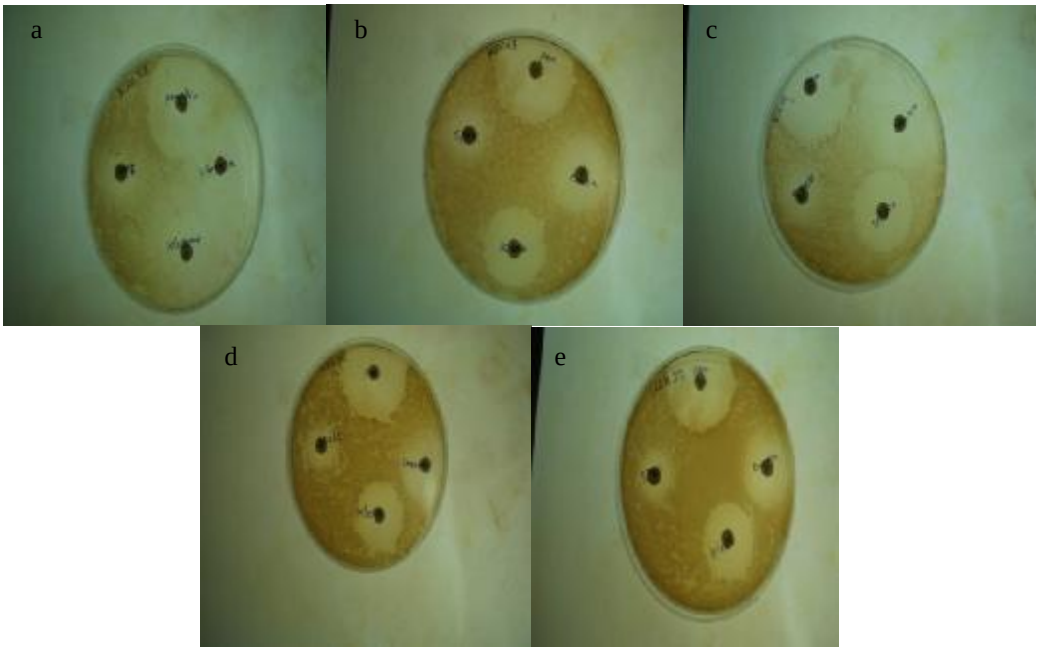
4.3.4. *Bacillus* sp. CU-48 Suşu ve Mutantlarının Antibiyogram Analizi

Bacillus sp. CU-48 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin antibiyogram testi yapılmıştır. CU-48 ile mutant varyetelerin antibiyogram sonuçları Çizelge 4.9 ve Şekil 4.24'de verilmiştir.

Çizelge 4.9: *Bacillus* sp. CU-48 ve mutant varyetelerinin antibiyogram Testi sonuçları

Bakteri suşu	Penisilin	Gentamisin	Streptomisin	Kloramfenikol
Bacillus sp. CU-48	−	−	−	−
Bacillus sp. CU48-M1	−	−	−	−
Bacillus sp. CU48-M2	−	−	−	−
Bacillus sp. CU48-M3	−	−	−	−
Bacillus sp. CU48-M4	−	−	−	−

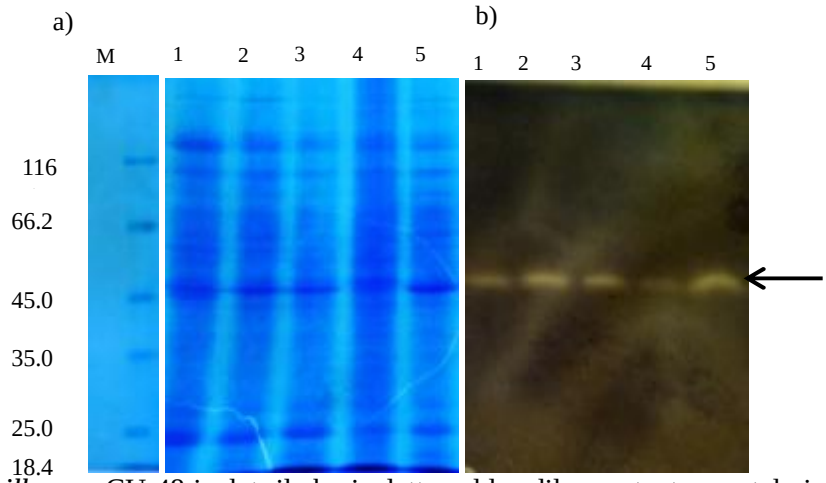
(+): antibiyotiğe dirençli, (-): antibiyotiğe hassas.



Şekil 4.24. *Bacillus* sp. CU-48 ile mutantlarına ait antibiyogram test plaklarının görüntüsü: a) CU-48, b) CU48-M1, c) CU48-M2, d) CU48-M3, e) CU48-M4.

4.3.5. CU-48 İle Mutantlarının SDS-PAGE ve SDS-NİŞASTA-PAGE'de Analizleri

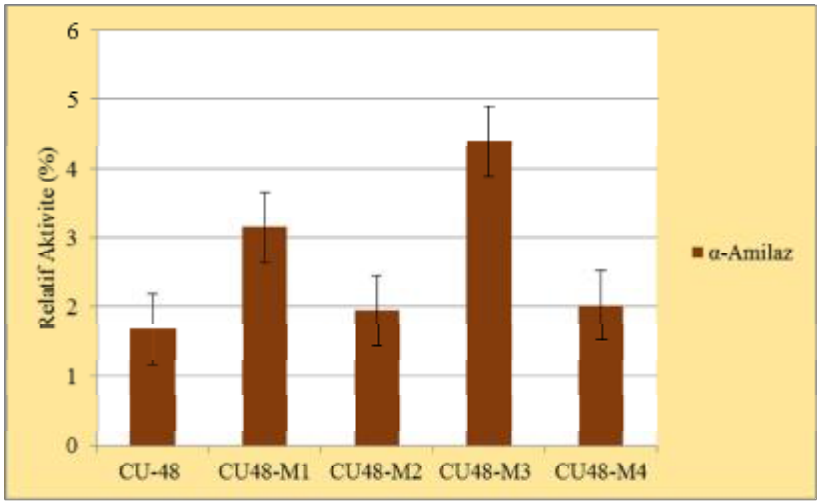
Bacillus sp. CU-48 ile bu izolattan elde edilen mutant varyeteler gerek toplam proteinleri bakımından SDS-PAGE'de, gerekse α-amilaz aktiviteleri bakımından SDS-Nişasta-PAGE'de karşılaştırılmışlardır. SDS-PAGE'de toplam protein bant profilleri incelendiğinde, bantların birbirleri ile benzerlik gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.25a). Ayrıca zimogram analizlerine göre tüm bakterilerin aynı moleküler ağırlıkta (yaklaşık 45 kDa) α-amilaz bantları ürettiği görülmektedir (Şekil 4.25b).



Şekil 4.25. *Bacillus* sp. CU-48 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin toplam protein bakımından SDS-PAGE'de (a), α-Amilaz aktivite bantı bakımından SDS-Nişasta-PAGE'de (b) karşılaştırılması. (M: marker, 1: CU-48, 2: CU48-M1, 3: CU48-M2, 4: CU48-M3, 5: CU48-M4).

4.3.6. *Bacillus* sp. CU-48 İzolatı İle Bu İzolattan Elde Edilen Mutant Varyetelerin Spesifik Aktiviteleri

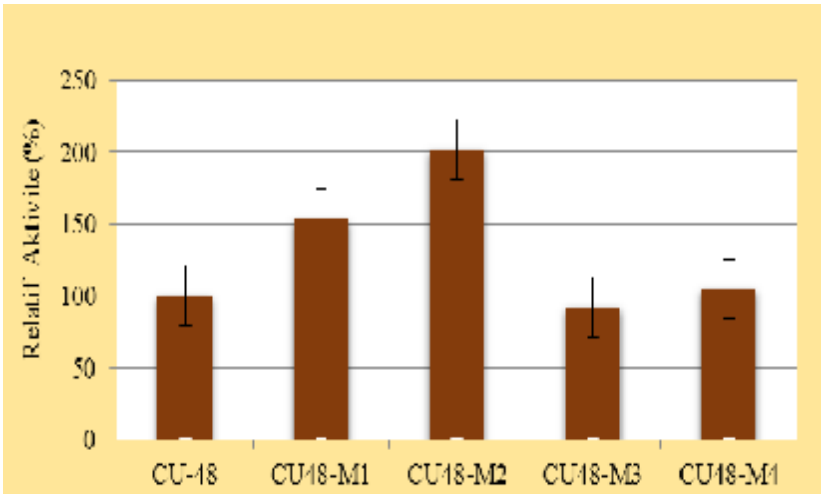
Bacillus sp. CU-48 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelere ait proteinler Lowry (1951) yöntemine göre analiz edilerek her bir suşa ait 1 mg proteinin 1 dakikada ne kadar substratı parçaladığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre CU-48 izolatı α-amilaz bakımından 1.67 nmol/dk/mg protein değerine sahipken CU48-M1, CU48-M2, CU48-M3 ve CU48-M4 mutantları sırasıyla 3.15, 4.40, 1.95 ve 2.02 nmol/dk/mg protein değerine sahip olmuşlardır. CMCaz enzim aktivitesi ise CU-48 izolatı 1.30 nmol/dk/mg protein değerine sahip olmuştur (Şekil 4.26.).



Şekil 4.26. *Bacillus* sp. CU-48 izolatı ile elde edilen mutant varyetelerin α-Amilaz ve CMCaz enzimi bakımından spesfik aktiviteleri.

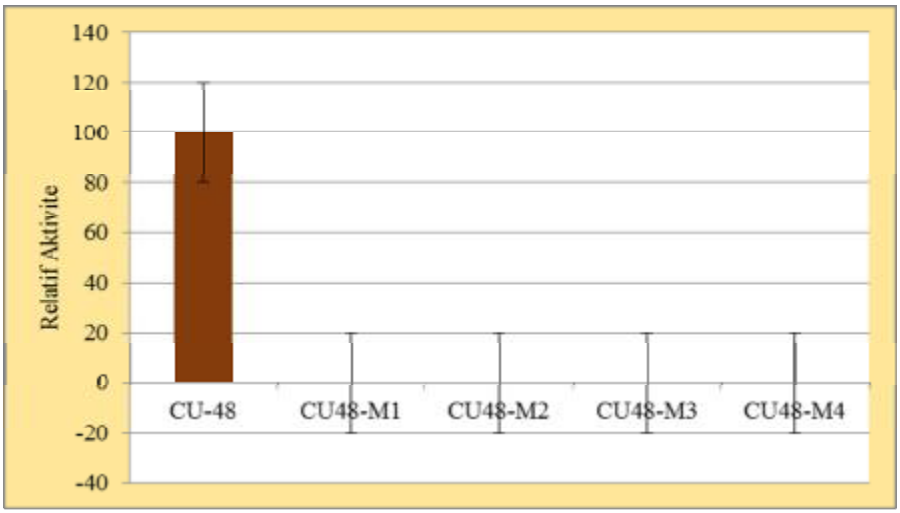
4.3.7. *Bacillus* sp. CU-48 İzolatı İle Bu İzolattan Elde Edilen Mutant Varyetelerin Enzim Aktiviteleri Bakımından Karşılaştırılması

Bacillus sp. CU-48 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyeteleri α-amilaz enzim üretimi bakımından karşılaştırıldığında; CU48-M1, CU48-M2 ve CU48-M4 suşlarının α-amilaz üretimin sırasıyla %52.98, %101.32 ve 4.63% oranlarında artırıldıkları, bunlara karşın CU48-M3 izolatın enzim üretiminin CU-48'e göre %7.62 oranında azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.27.).



Şekil 4.27. *Bacillus* sp. CU-48 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyetelerinin α-Amilaz üretimi bakımından spesifik aktivitelerinin relatif olarak karşılaştırılması.

Bacillus sp. CU-48 izolat ile bu izolattan elde edilen mutant varyeteler karşılaştırıldığında; bütün mutantların orjinal izolata göre CMCaz aktiviteleri köreldikleri gözlenmiştir (Şekil 4.28.).

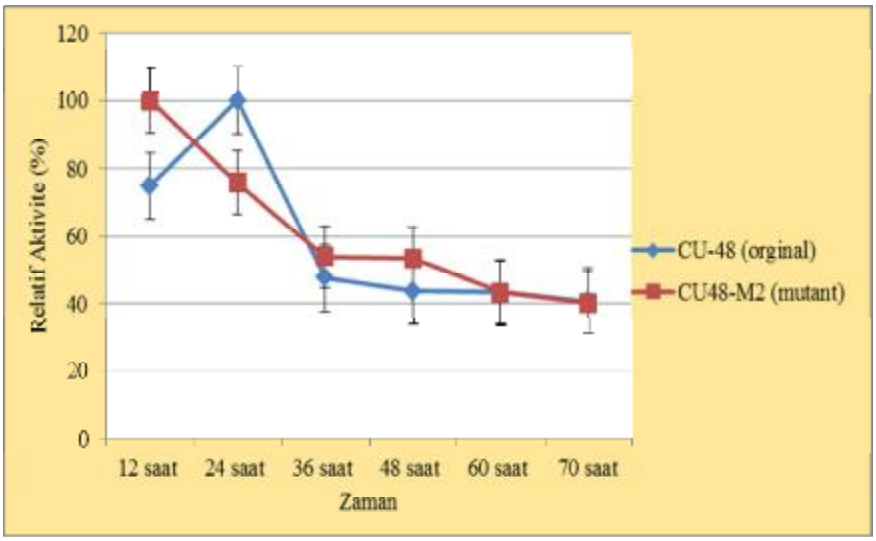


Şekil 4.28. CU-48 ile bu suştan elde edilen mutant suşları CMCaz enzim üretimi bakımından karşılaştırılması.

CU-48 izolatı ile Bu izolatından elde edilen mutant varyetelerin içinden en yüksek enzim aktiviteye sahip mutant varyete seçilip ve enzim analizleri yapılmıştır.

4.3.8. *Bacillus* sp. CU-48 İzolatın ve CU48-M2 Mutant Varyetesinin Zamana Göre Amilaz Aktiviteleri

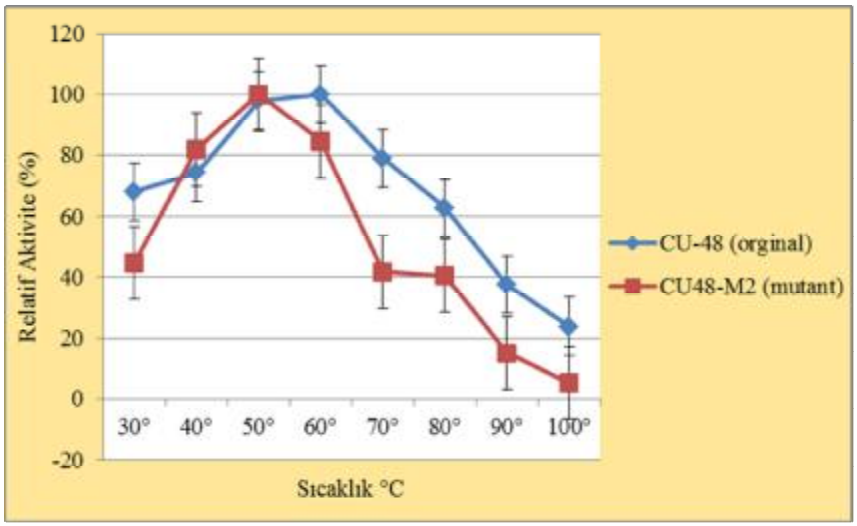
Bacillus sp. CU-48 izolatı ve bu izolattan elde edilen CU48-M42 mutant varyetenin amilaz üretimleri, bakterilerin üreme peryodlarının sırası ile 24 ve 12. saatinde maksimum düzeye çıkmıştır (Şekil 4.29.).



Şekil 4.29. *Bacillus* sp. CU-48 ile CU48-M2 mutantının zamana göre Amilaz aktivite grafiği.

4.3.9. *Bacıllus* sp. CU-48 İzolatın ve CU48-M2 Mutantına Ait α-amilaz Enzimlerinin Optimum Sıcaklıkları

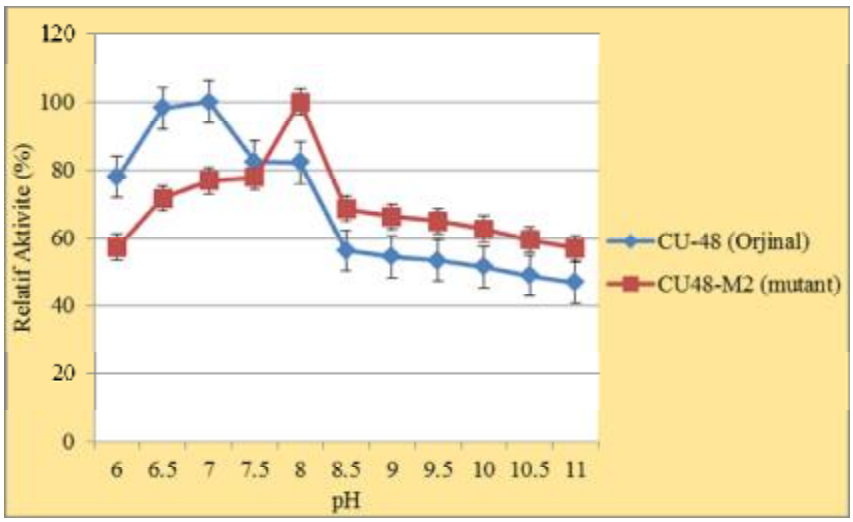
Bacillus sp. CU-48 izolat ile bu izolatdan elde edilen CU48-M2 mutantına ait α-amilaz enzimlerinin optimum sıcaklıkları sırasıyla 50-60°C arasında bulunmuştur (Şekil 4.30.).



Şekil 4.30. *Bacillus* sp. CU-48 ile CU48-M2'ye ait α-Amilaz enzimlerinin farklı sıcaklıklarda optimum aktivite grafiği.

4.3.10. *Bacıllus* sp. CU-48 İzolatın ve CU48-M2 Mutant Varyetesine Ait α-Amilaz Enziminin Optimum pH Değerleri

Bacillus sp. CU-48 izolatı ile CU48-M2 mutantı tarafından üretilen α-amilaz enzimlerinin aktivite göstermek için en uygun pH değerleri araştırılmış ve enzimlerinin optimum pH değerleri sırasıyla 7.0-8.0 aralığında belirlenmiştir (Şekil 4.31.).



Şekil 4.31. *Bacillus* sp. CU-48 izolatın CU48-M2 mutantına ait α-Amilaz enzimlerinin pH grafikleri.

4.3.11. İzolatların BLAST Programı İle Karşılaştırmaları

V-41, KH-13 ve CU-48 izolatlarının 16S rRNA sekansları CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment programı ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırılmanın sonucu V-41 ile KH-13 %98.75, V-41 ile CU-48 %97.92 ve KH-13 ile CU-48 %99.19 olasıkla benzerlik göstermişlerdir (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.10. V-41, KH-13 ve CU-48 izolatların 16S rRNA dizi eşleştirme sonuçları

```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment


V-41      GTGTCAGGATCATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAGTCTGATGTGAAATCTT 60
KH-13     GTGTC-GGATCATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAGTCTGATGTGAATCTTC 59
CU-48     ------GGATCATTGGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAGTCTGATGTGAATCTCT 54

**********************************************

V-41      GCGGCTCAACCGCTAAGCGGTCATTGGAA-CTGGGGGACT-TGAGTGCAGGAGAGGAAAG 118
KH-13     GCGGCTCAACCGC-AAGCGGTCATTGGAAACTGGGGGACT-TGAGTGCAGGAGAGGAAAG 117
CU-48     GCGGCTCA-CCGT-AAGCGGTCATTGGAA-CTGGGGGACTCTGAGTGCAGGAGAGGAA-G 110
                       ******** ***  *************** **********
***************** *

V-41      CGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG 178
KH-13     CGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG 177
CU-48     CGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG 170

************************************************************

V-41      CGGCTTTCTGGCCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG 238
KH-13     CGGCTTTCTGGCCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG 237
CU-48     CGGCTTTCTGGCCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG 230

************************************************************

V-41      ATACCCTGGT 248
KH-13     ATACCCTGGT 247
CU-48     ATACCGTGGT 240
                     ***** ****
```

Sequences (1:2) Aligned. Score: 98.75

Sequences (1:3) Aligned. Score: 97.92

Sequences (2:3) Aligned. Score: 99.19

4.4. Tartışma

Bu çalışma ile Van Gölü, Hazer Denizi ve Çukurova Üniversitesi kampüsünden alınan toprak ve su örneklerinden *Bacillus* sp. V-41 (Van Gölünden alınan örneklerden) *Bacillus* sp. KH-13 (Hazer Denizinden alınan örneklerden) ve *Bacillus* sp. CU-48 (Çukurova Üniversitesi kampüsünden alınan örneklerden) bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bacillus cinsi bakterilerin sınıflandırılmasında, aerobik, Gram-pozitif, çubuk sekilli olmaları ve endospor olusturmaları önemli yer tutmasına rağmen, türlerin

ayrımının güç olduğu ve yanlış tanımlamalar yapılabileceği bildirilmektedir. Yüksek derecedeki heterojenitenin standart testler ile tanımlamayı zorlaştırdığı ifade edilmektedir (Rosovitz ve ark., 1998; Priest,1993). Cinsin sahip olduğu geniş fenotipik çesitliliğin aynı zamanda geniş bir filogenetik dağılıma neden olduğu ve gelişmiş moleküler tekniklerle elde edilen kriterlerin organizmaların sınıflandırmasında esas yeri almıştır (Rosovitz ve ark., 1998). İzole edilen birçok suşun birbiriyle karıştırılması, suşlar arasında ayrım geliştirmek ve susların teşhisinin doğruluğunu ispatlamak zorunluluğunu gündeme getirmiştir. Ancak, sınıflandırma için geliştirilen morfolojik ve biyokimyasal testler ve fenotipik özellikler suşların ayrımı için yeterli olmadığından değisik yöntemler geliştirilmiştir (Bağcı ve ark., 1991).

Ribozomal RNA genleri (rDNA) (16S, 23S ve 5S) bakterilerde yüksek derecede korunmus bölgelerdir. Özellikle de 16S rRNA genleri bakteri türleri arasında filogenetik yakınlığın belirlenmesi için oldukça sık kullanılmaktadır (Rainey ve ark., 1994). 16S rRNA dizi analizinin tür ya da cins seviyesinde bilinmeyen bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılması için kesin bir yöntem olduğu düsünülmektedir (Siefert ve ark., 2000).

V-41 izolatının 16S rRNA sekansı, BLAST programı (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) kullanılarak yapılan karşılaştırmada kültüre alınmamış bir bakteri olan HAV7D9G02CMKTO ile %97, KH-13 izolatı ise aynı programla *Bacillus* sp. M26 bakterisi ile %98 oranında benzerlik göstermişlerdır. Ayrıca CU-48 izolatı yine BLAST programı ile yapılan sekans analizi sonucunda *Bacillus thermolactis* ile %98 oranında benzerlik göstermiştir.

Elde edilen izolatlardan *Bacillus* sp. V-41 sadece α-amilaz aktivitesi gösterirken (α-amilaz^{+}, CMCaz^{-}, ksilanaz^{-} ve likenaz^{-}), *Bacillus* sp. KH-13 α-amilaz ve ksilanaz (α-amilaz^{+}, CMCaz^{-}, ksilanaz^{+} ve likenaz^{-}), *Bacillus* sp. CU-48 α-amilaz ve CMCaz (α-amilaz^{+}, CMCaz^{+}, ksilanaz^{-} ve likenaz^{-}) aktiviteleri göstermiştir. Bu izolatlar tarafından üretilen α-amilaz, CMCaz ve ksilanaz enzimleri hayvancılıkta yemi iyileştirici olarak kullanılan enzimler içerisin de yer almaktadır.

Yüksek düzeyde ham selüloz (HS) içeren kalitesiz kaba yemlerde fibrolitik enzimlerin, yüksek oranda nişasta içeren kuzu-buzağı başlangıç yemlerinde

amilazların kullanımının yemlerdeki sindirimini, yemlerdeki mevcut besin maddelerinin emilimini ve ME değerlerini artırdığı ifade edilmektedir (Karademir ve Karademir, 2003) sütten kesimdeki domuzlarda pankreasta amilaz ve proteaz üretiminin düştüğü ve domuzların sütten kesim sonrası yemlerine bu enzimlerin ilavesi faydalıdır (Godfrey ve West, 1996). Ruminantlarda nişastanın rumen yerine ince bağırsakta hidrolizi asidoz riskini azaltmaktadır. Fakat hidrolize olmamış nişastanın kolon (kalın bağırsak) ve sekuma (kör bağırsak) ulaşması durumunda hayvan nişastadan yeterince faydalanamadığı gibi fermentatif asidoza da sebep olabilmektedir (Channon ve Rowe, 2004). Kümes hayvanlarında ise pankreatik amilaz ve proteaz üretiminin kuluçkadan çıkıştan sonra hızla gelişmesine karşılık büyümenin ilk 10 gününde bu enzimlerin eksikliği gözlenebilmektedir (Nir ve ark., 1993). (Canoğulları ve ark,1999) mısır ve soya fasulyesi küspesine dayalı etlik piliç karma yemlerinde %0.1 düzeyinde α-amilaz enzimi kullanımının, kuru madde tüketimi, canlı ağırlık kazancı, but ve göğüsteki deri ve yağ oranları bakımından daha kaliteli karkas elde edilebileceğini bildirmiştir. Yine benzer bir çalışmada amilaz ve asit proteaz enzimlerince takviye edilmiş mısır-soya yemlemesi ile civcivlerin canlı ağırlık kazancının %20, yemden yararlanma oranının ise %5 düzeyinde arttığı bildirilmiştir (Kobayashi ve ark., 2002). α-Amilaz enzimi de içeren ticari enzim karışımları ile yapılan bir çalışmada ise etçi tavuklarda canlı ağırlık ve yemden yararlanmada bir artış meydana geldiği bildirilmiştir (Alam ve ark., 2003). V41-M4, KH13-M3 ve CU48-M2 yukarıdaki problemleri engellemek için hayvan rasyonlarında kullanılabililir.

Kanatlılarda besinlerin sindirim sisteminden geçiş hızı yüksektir (Ergün, 2001). Ruminantlardaki gibi gelişmiş bir mikrobiyal sindirime ve bitki hücre duvarını parçalayacak enzimlere sahip değillerdir. Dolayısıyla besin maddelerinden yeterince faydalanamazlar (Canoğulları ve ark., 1999; Sevgili ve ark., 1999). Kanatlı rasyonlarında kullanılan arpa, buğday, çavdar, yulaf gibi tahıllar yapılarında nişasta tabiatında olmayan polisakkaritleri (arpa ve yulafta betaglukanlar, buğdayda arabino ksilanlar, selüloz gibi) içerirler. Kanatlılar, söz konusu polisakkaritleri parçalayacak enzimlerden yoksun olduklarından bu yemlerden yeterince faydalanamazlar. Betaglukanlar ve arabino ksilanlar su tutma özelligine sahip olduklarından bagırsak

içeriginin viskozitesini arttırırlar. Viskozitenin artısı diger besin maddelerinin sindirimini de engeller. Ayrıca su tüketiminin artmasına neden olduğu için yer tipi kanatlı yetiştiriciliğinin en önemli problemlerinden biri olan "ıslak altlık" problemine yol açar. Uygun enzimlerin karma yemlere ilavesi bu sorunları ortadan kaldırabilmektedir (Canoğulları ve ark., 1999; Ergün, 2001, Sevgili ve ark., 1999). Mutasyon sonucu elde etdiğimiz mutant varyete KH13-M4 yukardaki problemleri engellemek için yem katkısı olarak kullanılabililir.

Bakterilerce enzim üretimin artırılmasında klonlama ve mutagenez en sık başvurulan moleküler tekniklerdir. Klonlama ile gen donör organizmanın genomundan izole edilmekte ve bir plazmit DNA aralığı ile endüstriyel bir üretim suşuna aktarılmaktadır. Burada plazmit DNA'nın kopya sayısına bağlı olarak enzim üretiminde ciddi bir artış sağlanabilmektedir. Diğer bir teknik olan invitro mutagenez ile, genin ekspresyonuna doğruda etki eden baskılayıcı genler hedef alınmakta, bu genlerin mutasyonu ile gen üzerindeki baskının ortadan kaldırılması ve böylece enzim üretiminde belli bir artışın sağlanması hedeflenmektedir. Bu teknik ile enzim üretimi ciddi şekilde artırılmış literatür bildirilmişleri bulunmaktadır. Örneğin (Reddı Pradeep ve ark., 2012), *Aspergillus niger* fungusunu EtBr ile mutasyona uğratıp selülaz aktvitesinin artırılmasını sağlamışlardır. Özcan (1996), çerçeve kayması mutasyonlarına neden olan ethidum bromid (EtBr) ugulayarak α-amilaz pozitif *Bacillus* sp. ORBA (1) suşunu α-Amilaz negatif bir suş haline dönüştürmüştür. Bu çalışmada ise EtBr *Bacillus* sp. CU-48 CMCaz aktivitesi pozitif halinden negatif haline dönüştü. Bilgilisoy (2003), iki *Bacillus sp.* (RSKK244, RSKK246) enzim üretimini değiştirmek amacıyla Ethyl-methansulphonate (EMS) ve Etihidium Bromid (EtBr) ile mutasyona uğratmıştır. Araştırıcı RSKK244 ve RSKK246'nın EMS ile muamelesi sonunda 244M1, 244M2 (likenaz^{-}, kisilanaz^{-}, CMCaz^{-}, α-Amilaz^{+}) ve 246M3 (likenaz^{+}, kisilanaz^{+}, CMCase^{-}, α-amilaz^{+}) kolonilerini oluşturmuştur.

Bu çalışmada elde edilen üç izolatın da Ethidium Bromid (EtBr) uygulaması ile mutasyona uğratılması ve enzim üretiminde belirgin bir artış sağlanması hedeflenmiştir. Yapılan çalışma ile, EtBr ile muamele edilmiş izolatlardan, EtBr damlatılmış toksik zonun kıyısından koloniler toplanmış ve bu koloniler ilgili substratı içeren LB-Agar besiyerlerine ekilmiştir. Daha sonra plakların boyanması ile

mutant kolonilere ait aktivite zon çapları orijinal izolata ait aktivite zon çapı ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma neticesinde zon çapları orijinal izolata ait zon çapından büyük olan 4'er adet mutant koloni belirlenmiştir. *Bacillus* sp. V-41'den elde edilen mutant koloniler V41-M1, V41-M2, V41-M3 ve V41-M4, *Bacillus* sp. KH-13'den elde edilen mutant koloniler KH13-M1, KH13-M2, KH13-M3 ve KH13-M4, *Bacillus* sp. CU-48'den elde edilen mutant koloniler ise CU48-M1, CU48-M2, CU48-M3 ve CU48-M4 olarak isimlendirilmişlerdir.

Bacillus sp. V-41 izolatından elde edilen V41-M1, V41-M2 ve V41-M3 mutantlarında α-amilaz üretiminde kısmi bir artış gözlenirken, V41-M4 mutantında yaklaşık %91'lik bir artış gözlenmiştir. İnvitro mutagenez sonucu yine enzim üretiminde önemli düzeyde artış *Bacillus* sp. CU-48 izolatının mutantların da rastlanmıştır. Bu izolatın mutantlarında CU48-M1'de α-Amilaz üretimi orijinal izolata göre yaklaşık %53 düzeyinde artarken bu oran CU48-M2 mutantında yaklaşık %101 düzeyinde olmuştur. Bu izolattan elde edilen mutant varyetelerin tamamında ise CMCaz aktivitesinin kaybolduğu gözlenmiştir.

Bacillus sp. KH-13 mutantlarında, α-Amilaz üretimin de önemli bir artış gözlenmezken, en ciddi değer değişiklikleri ksilanaz aktivitesin deki artış ile KH13-M2 (%28.42) ve KH13-M4 (%35.08)'de gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Van Gölü, Hazer Denizi ve Çukurova Üniversitesi kampüsünden alınan toprak ve su numunelerinden üç adet haloalkalifilik ve termofilik bakteri (*Bacillus* sp. V-41, *Bacillus* sp. KH-13 ve *Bacillus* sp. CU-48) izole edilmiştir. V-41 izolatı 16S rRNA dizi sekansları BLAST programı (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) kullanılarak %97 Uncultured bacterium clone HAV7D9G02CMKTO 16S ribosomal RNA gene, partial sequence ile ve KH-13 izolatı %98 oranında *Bacillus* sp. M26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence suşu ile benzerlik göstermişlerdır. CU-48 izolatında *Bacillus thermolactis* partial 16S rRNA gene, strain (R-6486) ile %98 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir.

1 Besiyerlerine nişasta, CMC, ksilan ve likenan ilave edilerek, izolatlara ait enzimatik aktiviteler araştırılmıştır. Bu analizler sonucunda *Bacillus* sp. V-41; α-Amilaz^{+}, CMCaz^{-}, ksilanaz^{-} ve likenaz^{-}, *Bacillus* sp. KH-13; α-Amilaz^{+}, CMCaz^{-}, ksilanaz^{+} ve likenaz^{-}, *Bacillus* sp. CU-48; α-Amilaz^{+}, CMCaz^{+}, ksilanaz^{-} ve likenaz^{-} bulunmuştur.

2 Her üç izolat da EtBr ile invitro mutagenesis işlemine tabi tutulmuş ve yine enzim aktivite zon büyüklükleri gözönünde bulundurularak her üç izolatdan da dörder adet mutant varyete belirlenmiştir.

3 *Bacillus* sp. V-41 bakterisinde elde edilen mutant varyeteler içinde V41-M4 mutantın da enzim aktivitesi orijinal bakteriye göre yaklaşık %91 daha yüksek bulunmuştur. Yine zimogram analizi *Bacillus* sp. V-41 izolatı ile mutant varyetelerin de α-amilaz aktivitelerinin yaklaşık 70 kDa ağırlığında tek bir proteinden kaynaklandığını göstermiştir.

4 *Bacillus* sp. KH-13 izolatı ile bu izolattan elde edilen mutant varyeteleri α-amilaz enzim üretimi bakımından karşılaştırıldığında; KH13-M1, KH13-M2 ve KH13-M4 suşlarının α-amilaz üretimin ise sırasıyla %11.47, %1.08, ve %7.04 oranlarında azaldığı, bunlara karşın KH13-M3 izolatın enzim üretiminin KH-13'e göre %15.74 oranında arttığı gözlenmiştir. ksilanaz enzimi aktivitesi bakımından ise KH13-M1'in %3.16 azaldığı ve KH13-M2,

KH13-M3 ve KH13-M4 sırasıyla % 28.42, 10.87 ve 35.08 enzim aktiviteleri arttığı görülmüştür. Yine zimogram analizi *Bacillus* sp. V-41 izolatı ile mutant varyetelerin de α-amilaz aktivitelerinin yaklaşık 66 kDa ağırlığında tek bir proteinden kaynaklandığı gösterilmiştir.

5 *Bacillus* sp. CU-48 bakterisinde elde edilen mutant varyeteler içinde V41-M2 mutantın da enzim aktivitesi orijinal bakteriye göre yaklaşık %101 daha yüksek bulunmuştur. Zimogram analizi sonucu *Bacillus* sp. CU-48 izolatı ile mutant varyetelerin de α-amilaz aktivitelerinin yaklaşık 45 kDa ağırlığında tek bir proteinden kaynaklandığını göstermiştir.

6 V-41 izolatı ile V41-M4 varyetenin, KH-13 ile KH13-M3 ve KH13-M4 varyetelerinin ve CU-48 ile CU48-M2 varyetenin kısmi karakterizasyon sonuçları özetle Çizelge 5.1' de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Normal bakteriler ile mutant varyetelerinin kısmi karakterizasyonları

analiz suş	Enzim	Zamana göre enzim aktivitesi	Sıcaklık °C		pH		Spesifik aktivite (nmol/dk/mg protein)
			Aralık	Optimum	Aralık	Optimum	
V-41	α-Amilaz	60 saatinde	40-70°C	60°C	6.5-10	8	0.65
V41-M4	α-Amilaz	48 saatinde	30-60°C	40°C	6.5-10	7.5	1.27
KH-13	α-Amilaz	12 saatinde	30-60°C	40°C	6-8.5	6.5	4.38
KH13-M3	α-Amilaz	12 saatinde	40-60°C	50°C	6 -7.5	6.5	5.05
KH-13	ksilanaz	24 saatinde	30-90°C	50°C	9-10	9.5	1.9
KH13-M4	ksilanaz	48 saatinde	40-80°C	60°C	6.5-10.5	9.5	2.58
CU-48	α-Amilaz	24 saatinde	40-70°C	60°C	6-8	7	1.67
CU48-M2	α-Amilaz	12 saatinde	40-60°C	50°C	7-8	8	4.4

Bu çalışma kapsamında izole edilen bakteriler ile bu bakterilerden elde edilen mutant varyeteler için aşağıda verilen çalışmalar önerilebilir:

1. *Bacillus* sp. V41-M4 ve CU48-M3 hayvan beslemede yüksek oranda nişasta içeren kuzu-buzağı başlangıç yemlerinde bu enzimleri kullanarak yemlerdeki sindirimini, yemlerdeki mevcut besin maddelerinin emilimini ve ME değerleri araştırılabilir.

2. Sütten kesimdeki domuzlarda pankreasta amilaz ve proteaz üretiminin düşmesinden dolayı, domuzların sütten kesim sonrası yemlerine bu enzimlerin ilavesi ile nişastadan yararlanma düzeylerinin üzerinde çalışmalar yapılabilir.
3. Bu genlerin endüstriyel üretim suşlarında klonlaması ile enzimlerin daha bol bir şekilde üretimleri gerçekleştirilebilir.
4. Kümes hayvanlarında pankreatik Amilaz ve proteaz üretiminin kuluçkadan çıkıştan sonra hızla gelişmesine karşılık büyümenin ilk 10 gününde bu enzimlerin eksikliği gözlenebilmektedir. Dolayısıyla KH13-M3, V41-M4 ve CU48-M2 varyetelerin etkilerini bu dönemde araştırılabilir.
5. Kanatlılar, söz konusu polisakkaritleri parçalayacak enzimlerden yoksun olduklarından bu yemlerden yeterince faydalanamazlar. Beta-glukanlar ve arabino ksilanlar su tutma özelligine sahip olduklarından bağırsak içeriğinin viskozitesini arttırırlar. Viskozitenin artışı diğer besin maddelerinin sindirimini de engeller. Ayrıca su tüketiminin artmasına neden olduğu için yer tipi kanatlı yetiştiriciliğinin en önemli problemlerinden biri olan "ıslak altlık" problemine yol açar. Bu problemlerin giderilmesinde KH13-M4 mutant varyetesine ait ksilanaz enziminin etkisi araştırılabilir.

KAYNAKLAR

ABDEL-AZİZ, M.S., TALKHAN, F.N., FADEL, M., ABOUZİED, A.A., and ABDEL-RAZİK, A.S., 2011. Improvement of Xylanase Production from Streptomyces Pseudogriseolus via UV Mutagenesis. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(5): 1045-1050. ISSN 1991-8178

ADELBURG, E.A., MANDEL, N., and CHEN, G.C.C., 1965. Biochemical and Biophysical Research Communications. 18,788.

AIBA, S., KITAI, K. and IMANKA, T., 1983. Cloning and expression of thermostable α-amylase gene from *Bacillus strearothermophilus* in *Bacillus strearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 46(5):1059-1065.

AKITA, M., KAYATAMA, K., HATADA, Y., ITO, S. and HORIKOSHI, K. 2005. A novel β-glucanase gene from *Bacillus halodurans* C-125. FEMS Microbiology Letters, 248:9-15.

ALAM, M.J., HOWLIDER, M.A.R., PRAMANIK, M.A.H. and HAQUE, M.A., 2003. Effect of exogenous enzyme in diet on broiler performance. International Journal of Poultry Science, 2(2): 168-173.

ALP, M., KAHRAMAN, R., KOCABAGLI, N., ABAŞ, İ., AKSU, H., 1999. Bugday ve Arpa ağırlıklı Rasyona katılan farklı enzim karmalarının Broyler performansına ve leum pH' na etkisi, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 23 (Eksayı 3): 617-622.

AMES, B.N. and WHITFIELD, H.J., 1966. Frameshift mutagenesis in *Salmonella*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31:221.

AMOOZEGAR, M.A., MALEKZADEHA, F., and MALİK, K.A., 2003. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. Journal of Microbiological Methods, 52:353– 359.

ARIKAN, B., UNALDI, N., CORAL, G., COLAK, O., AYGAN, A., GULNAZ, O., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. Process Biochemistry, 38: 1397-1403.

ARWERT. F. and VENEMA, G., 1973. Transformation in *Bacillus subtilis* fate of newly introduced transforming DNA. Molecular and General Genetics, 123:185-198.

ASGHER, M., ASAD, M.J., RAHMAN, S.U. and LEGGE, R.L., 2007. A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. J. Food Engineering, 79:950-955.

AUERBACH, C., 1969. Genetica (Moscov),.1:3-11.

AUSTRUP, K., 1981. Industrial Aspects of Biochemistry, pp. 23-29. FEBS, Dublin.

AVCIOGLU, B., EYUPOGLU, B. and BAKIR, U., 2005. Production and characterization of xylanase of a *Bacillus* strain isolated from soil. World Journal of Microbiology&Biotechnology, 21:65-68.

AYGAN, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. izolasyonu, amilaz, selülaz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Ç.Ü. F. B. E. Doktora Tezi.

AZIN, M. and NOROOZI, E., 2001. Random mutagenesis ve use of 2-deoxy-D-glucose as an antimetabolite for selection of α-amylase-over producing mutants of *Aspergilus oryzae*. World Journal of Microbiology and Biothecnology, 17: 747-750.

BAILEY, J.E., OLLIS, D.F., 1977. Biochemical Engineering Fundamentals: International Student Edition, Chapter, 1-7, 39-50.

BAJPAI, P., BAJPAI, K.P., 1987. High-temperature alkaline α-amylase from *Bacillus lichneiformis* TCRDC-B13. Biotechnology and Bioengineeria, 33: 72-78.

BAĞCI, H., SHAREEF, S. R. VE ÖZDAMAR. K., 1991. *Bacillus thuringiensis* varyetelerinin sınıflandırılmasında sayısal taksonominin uygulanması, Doğa Turkısh Journal of Biology, 5: 70-81.

BERGER, H., BAMMAR, W. J., and YANOFSKY., C., 1966. Spontaneous and ICR 191-A-induced framshifts in the A gene of *E.coli* tryptophan synthetase. Journal of Bacteriology, 96:1672.

BERNHARDSDOTTER, E.C.M.J., JOSEPH, D.N.G., GARRIOTT, O.K., and PUSEY, M.L., 2005. Enzymic properties of an alkaline chelator-resistant α-amylase from alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate L1711. Process Biochemistry, 40:2401-2408.

BİLGİLİSOY, M., 2003. Construction of *Bacillus subtilis* strains producing various enzymes by mutagenesis. Ç.Ü. Z. F. Yüksek Lisans Tezi.

BLANCO, A., VIDAL, T., COLOM, J. F. and PASTOR, F. I. J., 1995. Purification and properties of xylanase a from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. Applied and Environmental Microbiology, 61: 4468-4470.

BOK, J.D., YERNOOL, J-D.B.D. and EVELEIGH, D.E., 1998. Purification, characterization and molecular analysis of thermostable cellulase CelA and CelB from thermotoga neapolitana. Applied and Environmental Microbiology, 64: 4774-4781.

BRECCIA, J.D., SIFIERIZ, F., BAIGORI, M.D., CASTRO, G.R., and HATTIKAUL, R., 1998. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus* amyloliquefaciens. Enzyme and Microbial Technology, 22:42-49.

BROWN, D.F., 1966. X-ray-induced mutation in extracellular phages. Nature, 212:1595.

CHANNON, A.F. and ROWE, J.B., 2004. Manipulating gastrointestinal starch digestion to improve the efficiency of feed utilization. Australian Journal of Experimental Agriculture, 44(4-5): 475-482.

CANOGULLARI, S., OKAN, F., AYASAN, T., 1999. Etlik piliç karma yemlerine α-amilaz ve proteaz katkısının performansa ve karkas özelliklerine etkileri, p:505-514. VİV. Poultry Yutav'99 Uluslar arası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı 3-6 Haziran Bildiriler Kitabı, Istanbul.

CEYLAN, N., SARICA, S., GÜRSOY, Ü., 1999. Kanatlı yemlerinde fitin fosfor yarayışlılığını artırmaya yönelik uygulamalar, s. 321-329. VİV. Poultry Yutav'99 Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı 3-6 Haziran Bildiriler Kitabı, Istanbul.

CHANNON, A.F. and ROWE, J.B., 2004. Manipulating gastrointestinal starch digestion to improve the efficiency of feed utilization. Australian Journal of Experimental Agriculture, 44(4-5): 475-482.

CHEN, Z., WOJCIK, S. F. and WELKER, N., 1985. Genetic analysis of *Bacillus stearothermophilus* by protoplast fusion. Journal of Bacteriology, 165(3): 984-1001.

CHEN, X., WHITMIRE, D., BOWEM, J.P., 1996. Xylanase homology modeling using the inverse protein folding. Approach. Protein Science, 5: 705-708.

CHRISTOV, L.P., AKHTAR, M., PRIOR, B.A., 1996. Impact of xylanase and fungal pretreatment on alkali solubility and brightness of dissolving pulp. Biobleaching of Sulphite Pulp, 50: 579-582.

COŞKUN, A., 2010. Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacıllus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve karakterizasyonu. Ç.Ü. F. Z . Yüksek Lisans Tezi.

COŞKUN, B., ŞEKER, E., İNAL, F., (2000). Yemler ve teknolojisi, 3. baskı, S. Ü. Vet. Fak. Yay., Konya.

CORNELIS, P., DIGNEFFE, C., WILLEMANT, K., 1982. Cloning and expressıon of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *Escherichia coli*. Molecular and General Genetics, 186: 507-511.

COOK, G. M., RAINEY, F. A., PATEL, B. K. C., and MORGAN, H. W., 1996. Characterization of a new obligately anaerobic thermophile, *thermoanaerobacter wiegelii* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, l (46): 123-127.

CRICK, F.H.C., BARNETT, L., BRENNER, S. and WATTS-TOBIN, R.J., 1961. General nature of the genetic code for proteins. Nature, 192:1227.

DANSON, M.J. and HOUGH, D.W., 1998. Structure, function and stability of enzymes from the Archaea. Trends in Microbiology, 6:307– 314.

DAS, K., DOLEY, R. and MUKHERJEE,A.K., 2004. Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic, extracellular α-amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a strain isolated from the tradition fermented food of India. Biotechnology and Applied Biochemistry, 40:291-298.

DEMAIN, A.L., and SOLOMON, N.A., 1981. In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering, pp. 3-14. Scientific American, Freeman &Comp., San Francisco.

DEMİREL, R., GÜRBÜZ, Y., 1999. Karma yemlerde enzim kullanımı, s.489-495. VİV. Poultry Yutav'99 Uluslar arası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı 3-6 Haziran Bildiriler Kitabı Istanbul.

DEMIRJIAN, D.C., FRANCISCO, M.V. and CONSTANCE, S.C., 2001. Enzymes from extremophiles. Current Opinion in Chemical Biology, 5: 144-151.

DEMİRKAN, E., 2011. Production, purification, and characterization of α-amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivates. Turkish Journal of Biology, 35 : 705-712.

DEUTCH, C.E., 2002. Characterization of a salt-tolerant extracellular a-amylase from *Bacillus dipsosauri.* Letters in Applied Microbiology, 35: 78– 84.

DUEDAHL-OLESEN, L., KRAGH, K.M. and ZIMMERMANN, W., 2000. Purification and characterisation of a malto-oligosaccharide-forming amylase active at high pH from *Bacillus clausii* BT-21. Carbohydrate Research, 329: 97– 107.

EICHLER, J., 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. Biotechnology Advances, 19: 261- 278.

EISENBERG, H. and WACHTEL, E. J., 1987. Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 16:69-92.

EISENSTARK, A., EISENSTARK, R. and VANSICLE, R., 1965. Isolation of mutants. Mutation Research, 2: 1-10.

ENDO, K., HAKAMADA, Y., TAKIZAWA, S. and KUBOTA, H., 2001. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences. Applied Microbiology and Biotechnology, 57: 109-116.

ENGLE, M., LI, Y., WOESE, C. and WIEGEL, J., 1995. Isolation and characterization of a novel alkalitolerant thermophile, *Anaerobranca horikoshii* gen. nov., sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 45: 454– 461.

ERGÜN, A., 2001. Tavukların beslenmesi, s. 265-303. Ed. Ergün A., Tuncer S.D., Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları, Medipres, Ankara.

FENGEL, D., WEGENER, G., 1989. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter, Berlin.

FREESE, E., 1959. The difference between sportaneous and base-analogue induced mutation. Brookhaven Symposium Biology., 12:63.

FUGI, M., TAKAGI, M., IMANAKKA, T., and AIBA, S., 1983. Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus streanothermophilus* in a vector plazmid and its expression in *Bacillus streanothermophilus* and B. subtilti. Journal of Bacteriology, 154: 831-7.

GESSESSE, A., 1998. Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Applied and Enviromental Microbiology. p. 3533-3535.

GOLYASNAYA, N. V., TURINA, N. A., 2000. Culture age of *Escherichia coli* and the frequency of mutation inducel by N-methyl-N-Nitro-N-Nitroso guanidin. Microbiology, 69(6): 684-688.

GOMES, J., and STEINER, W., 2004. Extremophiles and extremozymes. Food Technology and Biotechnology, 42(4): 223– 235.

GÜMÜŞEL , F., 2002. Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü. Kocaeli Sanayii İçin Teknolojik Uzgörü Ortak Projesi. S. 73-135.

HAGIHARA, H., IGARASHI, K., HAYASHI, Y., ENDO, K., IKAWA-ITAYAMA, K., OZAKI, K., KAWAI, S. and ITO, S., 2001. Novel a-amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. Applied and Enviromental Microbiology, 67:1744- 1750.

HAKI, G.D., RAKSHIT, S.K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology, 89: 17-34.

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

HARTMAN, P.A., WELLERSON, R. Jr., and TETRAULT, P.A., 1955. *Bacillus stearothermophilus* I. Thermal and pH stability of the amylase. Journal of Bacteriology, 3: 7-10.

HAQ, I., ALI, S., JAVED, M.M., HAMEED, U., SALEEM, A., ADNAN, F., and QADEER, M.A., 2010. Productıon of alpha amylase from a randomly induced mutant straın of *Bacillus amyloliquefaciens* and its applicatıon as a desizer in textile industry. Pakistan Journal of Botany, 42(1): 473-484.

HOPWOOD, D. A., 1970. Isolation of mutants. Methods in Microbiology, vol. 3A, p. 3363. Academic Press, New York.

HREGGVIDSSON, G.O., KAISTE, E., HOLST, O., EGGERTSSON, G., PALSDOTTIR, A., and KRISTJANSSON, J.K., 1996. An extremely thermostable cellulase from the thermophilic *Eubacterium rhodothermus* marinus. Applied and Enviromental Microbiology, 62: 3047-3049.

HORIKOSHI , K., and GRANT, W.D., 1998. Extremophiles: microbial life under extreme conditions. Wiley-Liss. New York. pp. 155-180.

HORIKOSHI, K., 1999. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology. Rev, 63: 735-750.

IGARASHI, K., HATADA, Y., HAGIHARA, H., SAEKI, K., TAKAIWA, M., UEMURA, T., ARA, K., OZAKI, K., KAWAI, S., KOBAYASHI, T. and ITO, S., 1998. Enzymatic properties of a novel liquefying α-amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. Applied and Enviromental Microbiology, 64: 3282-3289.

JOHNVESLY, B., NAIK, G.R., 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. Process Biochemistry, 37: 139-144.

KANG, H-J., UEGAKI, K., FUKADA, H. and ISHIKAWA, K., 2007. Improvement of the enzymatic activity of the hyperthermophilic cellulase from *Pyrococcus horikoshii*. Extremophiles, 11: 251-256.

KARADEMİR, G., KARADEMİR, B., 2003. Yem katkı maddesi olarak kullanılan byoteknolojik ürünler. Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg, 43(1): 61-74.

KESKİN, H., 1982. Besin Kimyası. Fatih Yayınevi, Cilt II. İstanbul, s: 558.

KIM, T.U., GU, B.G., JEONG, J.Y., BYUN S.M. and SHIN, Y.C., 1995. Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline α-amylase from and alkalophilic strain, GM8901. Applied and Enviromental Microbiology, 61: 3105-3112.

KIM, J-Y., HUR, S-H., and HONG, J-H., 2005. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. Journal of Biotechnology Letters, 27: 313-316.

KIRKPINAR, F., BASMACIOGLU, H., 2001. Etlik piliç karma yemlerinde soya küspesi yerine bir enzim karısımı ilave ederek ayçiçegi küspesi kullanımı. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 25: 905-912.

KNEEN, E., and SANDSTEDT, R.M., 1946. Application of the amylases in milling and baking technology. (J.A.Anderson, Editör), Enzyme and Their Role in Wheat Technology. Interscience Publishers, Inc., New York. p, 89-126.

KOBAYASHI, T., MURAI, A., OKADA, T. and OKUMURA, J., 2002. Influence of dietary phosphorus level on growth performance in chicks given corn-soybean diet supplemented with amylase and acid protease. Journal of Animal Science, 73: 215-220.

KOTCHONI, S.O., and SHONUKAN, O.O., 2002. Regulatory mutations affecting the synthesis of cellulase in *Bacillus pumilus*. World Journal of Microbilogy and Biotechnology, 18: 487-491.

KRISHNA, C., 1999. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana waste. Bioresorce Tech, 69: 231-239.

KUMAR, S., and NUSSINOV, R., 2001. How do thermophiles deal with heat? Cellular and Molecular Life Sciences, 58: 1216– 1233.

KUSHNER, D.J., 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In Kushner D.J. (ed) Microbial Life In Extreme Environments. London: Academic Pres, 317-368.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the Bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

LAMA, L., CALANDRELLI, V., AGATA, GAMBACORTA, A., NICOLAUS, B., 2004. Purification and characterization of thermostable xylanase and β-xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. Research in Microbiology, 155: 283-289.

LEE, S., MORIKAWA, M., TAKAGI, M., IMANAKA, T., 1994. Cloning aapt gene and characterization its product, α-amylase, pullulunase (appt), from thermophilicand alkaliphilic *Bacillus* sp. strain XAL601. Application Environment Microbiology, 60: 3761-3773.

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

LERMAN, L.S., 1963. The stracture of the DNA-ACRIDINe complex. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. L9: 94-102.

LIAMAS, I., BEJAR, V., ARGANDONA, M., QUESADA, E. and MORAL, A., 1999. Chemical mutagenesis of *Halamonas eurihalina* and selection of exopoli saccharide-deficient variants. Biotechnology Letters, 21: 367-370.

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

LOPEZ, C., BLANCO, A. and PASTOR, F.I.J., 1998. Xylanase production by a new alkalitolerant *Bacillus*. Biotechnology Letters, 20: 243-246.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, 193: 265- 271.

MADERN, D., EBEL, C., and ZACCAI, G., 2000. Halophilic adaptation of enzymes. Extremophiles, 4: 91-98.

MARGESIN, R., and SCHINNER, F., 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extremophiles, 5: 73-83.

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

MCALLISTER, T., HRISTOV, A. N., BEAUCHEMIN, K. A., RODE, L. M., and CHENG, K., 2001. Enzymes in ruminant diets. Bedford Mr, Partridge Gg. Enzymes In Farm Animal Nutrition. Uk: Bowman Cabi Publishing., Pp. 273-298.

MEGENT, R., 1965. Screening by visual examination of colonies. Mutation Research, 2: 328-331.

MİDİLLİ, M., TUNCER, S.D., 2001. Broyler rasyonlarına katılan enzim ve probiyotiklerin besi performansına etkileri. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 25:895-903.

MIJTS, B. N., and PATEL, B.K.C., 2002. Cloning, sequencing and expression of an alpha-amylase gene, amyA, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme. Microbiology, 148: 2343-2349.

MOHAMED, S.A., TALKHAN, F.N., FADEL, M., ABOUZIED, A.A., ABDEL-RAZIK, A.S., 2011. Improvement of xylanase production from *Streptomyces pseudogriseolus* via UV mutagenesis. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(5): 1045-1050.

MORGAN, F.J. and PRIEST, F.G., 1981. Characterization of a thermostable α-amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. Journal of Applied Bacteriology, 50: 107-114.

MORPURGO, G. and SERMONTI, G., 1959. Directed mutagenesis with sodium bisulfite. Genetics, 44:137-152.

NICHOLSON, W.L. and CHAMBLISS, G.H., 1985. Isolation and characterization of a cis-acting mutation conferring catabolite repression resistance to alpha-amylase synthesis in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 161(3): 875–881.

NICHOLSON,W.L. and CHAMBLISS, G.H., 1986. Molecular cloning of cis-acting regulatory alleles of the *Bacillus subtilis* amyR region by using gene conversion transformation. Journal of Bacteriology, 165(3): 663– 670.

NIIMURA, Y., YANAGIDA, F., UCHIMURA, T., OHARA, N., SUZUKI, K., and KOZAKI, M., 1987. A new faculative anaerobic xylan using alkalophile lacking cytochrome, quinone, and catalase. Agricultural and biological chemistry, 51: 2271-2275

NIEHAUS, F., BERTOLDO, C., KAHLER, M., and ANTRANIKIAN, G., 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Applied Microbiology and Biotechnology, 51:711– 29.

NIR, I., NITSAN, Z., and MAHAGNA, M., 1993. Comparative growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler and egg type chicks after hatching. British Poultry Science, 34:523-532.

OBAYASHI, A., HIRAOKA, N., KITA, K., NAKAJIMA, H., and SHUZO, T. 1988. Process for producing restriction enzyme. US Patent 4: 724, 209, US Cl. 435/199.

ONISHI, H., and SONODA, K., 1979. Purification and some properties of an extracellular amylase from a moderate halophile, *Micrococcus halobius*. Applied and Environmental Microbiology, 38:616-620.

ORGEL, A. and BRENNER, S., 1961. Mutagenesis of bacteriophage T4 by acridines Journal of Molecular Biology, 3: 726-768.

O'SULLIVAN, D.J., and İBRAHİM, S.A., 2000. Use of chemical mutagenesis for the isolation of food grade β-galactosidase overproducing mutant of bifidobacteria lactobacilli and *Streptococcus thermophilus*., Journal of Dairy Science, 83: 923-930.

ÖZCAN, N., 1996. Ethidium bromid ugulaması ile α-amilaz negatif *Bacillus subtilis* mutant suşlarının oluşturulması ve karekterizasyonu. Ç. Ü. Z. F. Dergisi, 11(4): 87-96.

ÖZEN, N., 2007. Hayvan Besleme. http:// www.zmo.org.tr / etkinlikler / 6tk05 / 037 nihatozen. pdf (30.04.2007).

PE´REZ-POMARES, F., BAUTISTA, V., FERRER, J., PIRE, C., MARHUENDA-EGEA, F. C., and BONETE, M. J., 2003. α-Amylase activity from the halophilic archaeon ***Haloferax mediterranei.*** Extremophiles, 7: 299– 306.

PRABAKARAN, M., THENNARASUI, V., AYESWARIYA MANGALA, R., BHARATHIDASAN, R., CHANDRAKALA, N., and MOHAN, N., 2009. Comparative studies on the enzyme activities of wild and mutant fungal strains isolated from sugarcane field. Indian Journal of Science and Technology, Vol. 2: 0974- 6846.

PODKOVYROV, S.M., and ZEIKUS, J.G., 1992. Structure of the gene encoding cyclomaltodextrinase from ***Clostridium thermohydrosulficum*** 39E and characterization of the enzyme purified from ***Escherichia coli.***, Journal of Bacteriology, 174: 5400-5405.

PRİEST, F.G., 1993. ***Bacillus***, Biotechnology, Biological Fundamentals, Vol. 1, byedited Sahm H., Wiley-Vch Verlag Gmbh, Weinheim,1267-1280.

Rainey, F.A., Fritze, D., Stackebrandt, E., 1994. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus ***Bacillus*** as revealed by 16S rDNA analysis, FEMS Microbiology Letters, 115: 205– 212.

RAJU, E.V.N., DIVAKAR, G., SWETHA, C., GEETHA, J., and SATISH, P., 2012. Strain improvement of ***Aspergillus niger*** for glucoamylase by physical and Chemicalmutagens. International Research Journal of Pharmaceutical Applied Sciences, 2(2): 79-91.

RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GATHE, M.S., and DESHPANDE, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2(3): 597-635.

REDDI PRADEEP, M., JANARDHAN, A., PRAVEEN KUMAR, A., and NARASIMHA, G., 2012. Induction of chemical mutations in ***Aspergillus niger*** to enhance cellulase production. International Journal of Environmental Biology, 2(3): 129-132.

RITCHIE, D.A., 1965. Mutagenesis with light and proflavine in phage T4. II. properties of the mutants. Genetics Research, 6.474-478.

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

RODRIGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRAQUERO, F., and RAMOSCORMENZANA, A., 1981. Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. Microbial Ecology, 7: 235-243.

ROSOVİTZ, M.J., VOSKUİL, M.I., CHAMBLİSS, G. H., 1998. *Bacillus*, Topley and Wilson' s Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, 9nd Edition, Volume 2, by edited Collier L., Balows, A. and Susman, M.,Oxford University Pres, New York, 709-730

ROSSI F., RUDELLA A., MARZOTTO M., DELLAGLIO F., 2001. Vector-free cloning of a bacterial endo-1, 4-β-glucanase in *Lactobacillus plantarum* and its effect on the acidifying activity in silage: Use of recombinant cellulolytic *Lactobacillus plantarum* as silage inoculant. Antonie van Leeuwenhoek, 80 (2): 139-147

RUTHERFURD, S.M., CHUNG, T.K., MAUGHAN, P.J., (2002). The effect of microbial phtase on ileal phosphorus and acid digestibility in the Broiler chicken. British Poultry Science, 43: 598-606.

SAITO, N., YAMAMOTO, K., 1975. Regulatory factors affecting α-amylase production in *Bacillus licheniformis*. Journal of Bacteriology, 121(3): 848-856.

SAMBROOK, J., and RUSSELL, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

SA´ NCHEZ-PORRO, C., MELLADO, E., BERTOLDO, C., ANTRANIKIAN, G., and VENTOSA, A., 2003. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. Extremophiles, 7: 221– 228.

SA-PEREIRA, P., MESQUITA, A., DUARTE, J.C., BARROS, M.R.A., and COSTAFERREIRA, M., 2002. Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain *Bacillus subtilis* and its properties. Enzyme and Microbial Technology, 30: 924-933.

SAUL, D.J., WILLIAMS, L.C., GRAYLING, R.A., CHAMLEY, L.W., LOVE, D.R. and BERGQUIST, P.L., 1990. celB, a gene coding for a bifunctional cellulase from the extreme thermophile *caldocellum saccharolyticum.* Applied and Environmental Microbiology, 56: 3117-3124.

SAXENA, R.K., DUTT, K., AGARWAL, L., and NAYYAR, P,. 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. Bioresource Technology, 98: 260-265.

SCHWARTZ, D.O., and BECKWITH, J.R., 1969. Mutagens which cause deletion in *Escherichia coli.* Genetics, 61:371.

SEVGİLİ, H., ÖZEN, N., ERTÜRK, M.M., 1999. Arpa-buğday ağırlıklı bıldırcın karma yemlerinde enzim kullanımının performansa etkileri. s.617-625. VV. Poultry Yutav'99 Uluslar arası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı 3-6 Haziran Bildiriler Kitabı, Istanbul.

SIDHU, G.S., SHARMA, P., CHAKRABARTI, T., GUPTA, J.K., 1997. Strain improvement for the production of a thermostable a-amylase. Enzyme and Microbial Technology, 21: 525-530.

SIEFERT, J.L., LARIOS-SANZ, M., NAKAMURA, L.K., SLEPECKY, R.A., PAUL, J.H., MOORE, E.R., FOX, G.E., JURTSHUK J.R., P., 2000. Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico, Current. Microbiolgy, 41: 84– 88.

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

SINGH, J., BATRA, N., and SOBTI, R.C., 2004. Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31: 51-56.

SPIZIZEN, J., 1965. Analysis of asporogenic mutants in *Bacillus subtilis* by genetic transformation, p. 125-137. In L. L. Campbell and H. O. Halvorson (ed.), Spores III. American Society for Microbiology, Ann Arbor, Mich.

SRIVASTAVA, R.A.K., 1987. Purification and chemical characterization of thermostable amylase produced by *Bacillus stearothermophilus*. Enzyme and Microbial Technology, 9: 749-754.

STARK, E., and TETRAULT, P.A., 1951. Isolation bacterial, cell-free, starch saccharifying enzymes from the medium at 70°C. Journal of Bacteriology, 62: 247-249.

STERNER, R., and LIEBLE, W., 2001. Thermophilic adaptation of proteins. Crit. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 36: 39-106.

STONE, B.A., CLARKE, AE., 1992. Chemistry and Biology of (1-3)-β-Glucans. La Trobe University Press, Victoria, Australia, pp. 355– 429.

STREISINGER, G., OKADA, Y., EMRICH, J., NEWTON, J., TSUGITA, A., TERZAGHI, E., and INOUYE, M., 1966. Frameshift mutations and the genetic code. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol, 31:77.

THEATHER, R.M., WOOD, P.J., 1982. Use of Congo-red polysaccaride interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovin rumen. Applied and Environmental Microbiology, 43: 777-780.

THOMPSON, L.H., and BEKER, R.M., 1973. Matings between male and female cells. Methods in Cell Biology, 7: 209.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. and GIBSON, T. J., 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22:4673-4680.

TSENG, M-J., YAP, M-N., RATANAKHANOKCHAI, K., KYU, K.L., and CHEN, S-T., 2002. Purification and characterization of two cellulase free xylanase from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. Enzyme and Microbial Technology, 30: 590-595.

TRIPATHI, U., VENKATESHWARAN, G., SARADA, R. and RAVISHANKAR, G. A., 2001. Studies on *Haematococcus pluvialis* for improved production of astaxanthin by mutagenesis. World Journal of Microbiology and Biothecnology, 17: 143-148.

VELESCO, L., FERNANDEZ-MARTINEZ, J.M., and DE HARO, A., 1999. Intraspecific breeding for reduced glucosinolate content in Ethiopian mustard (Brassica carinaa A. Braun). Euphytica, 106: 125-130.

VOGEL, H.J., and BONNER, D, M., 1956. Enrichment methods for auxotrophs.The Journal of Biological Chemistry, 218: 97-106..

VU, V.H., PHAM, T.A., and KIM, K., 2009. Fungal strain improvement for cellulase production using repeated and sequential mutagenesis. Mycobiology, 37(4): 267-271.

WAINØ, M., and INGVORSEN, K., 2003. Production of β-xylanase and β-xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis.* Extremophiles, 7: 87– 93.

LOTFY, W.A., GHANEM, K.M., EL-HELOW, E.R., 2007. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate:I. Mutagenesis and cost reduction studies. Bioresource Technology, 98: 3464– 3469.

WEJSE, P.L., INGVORSEN, K., and MORTENSEN, K.K., 2003. Purification and characterisation of two extremely halotolerant xylanases from a novel halophilic bacterium. Extremophiles - Springer, 7: 423– 431.

WEJSE, P.L., INGVORSEN, K., and MORTENSEN, K.K., 2003. Xylanase production by a novel halophilic bacterium increased 20-fold by response surface methodology. Enzyme and Microbial Technology, 32: 721-727.

WISEMAN, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, p. 274-373.

WHITFIELD, H.J., 1966. Framshift mutagenesis in *Salmonella.* Cold Spring Harbor Symo. Quant. Biol. 31: 221.

YAMASHIRO, K., YOKOBORI, S.I., KOIKEDA1, S., and YAMAGISHI, A., 2010. Improvement of *Bacillus circulans* β-amylase activity attained using the ancestral mutation method. Protein Engineering, Design & Selection vol. 23, no. 7 pp. 519– 528.

YANG, V.W., ZHUANG, Z., ELEGIR, G., and JEFFRIES, T.W., 1995. Alkalineactive xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from kraft pulp. Journal of Industrial Microbiology, 15: 434-441.

YANOFSKY, C., 1966. Amino acid replecements with mutation and recombination in the a gene and their relationoship to in vitro coding data. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol, 28: 581.

YONNEDA, Y., 1982. Mutation of *Bacillus subtilis* causing hyper production of amylase and protease and it's synergistic effect, Journal of Bacteriology, 124:48-54

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

ZHANG, Z., SCHWARTZ, S., WAGNER, L., and MILLER, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput Biol, 7(1-2):203-214.

ZANINI, S.F., SAZZAD, M.H., (1999). Effects of microbial phytase on growth and mineral utilisation in broilers fed on maize soyabean-based diets. British Poultry Science, 40(3): 348-52.

ZAPROMETOVA, O.M., ULEZLO, I.V., 1981. Studies on the optimal cultivation conditions of *Cephalosporium* sp., a producer of a-galactosidase., Mikrobiol. Promst., 4: 20.

ÖZGEÇMİŞ

İran uyruklu, 21/02/1974 yılında Oroumieh' de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Oroumieh' de tamamladıktan sonra 2002 yılında lisans ve 2009 yılında Yükeksek lisansın İran Azade Shabestar Üniversitesi Zootekni Bölümün' den mezun oldu. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalın' da Doktora eğitimine başladı. Evli ve iki çocuk babasıdır.

EKLER

EK-1. SOLÜSYONLAR

1.1. Bakteri İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri

1.1.1. LB Sıvı (1 litre için)

Bileşimi

10 gr Bakto tripton

10 gr NaCl

5 gr Maya ekstraktı (Yeast extract)

Yukarıda verilen miktarlar 1 litre için olup, farklı hacimde LB besiyeri hazırlanacaksa bu miktarlar o hacme göre orantılanarak tartılmalıdır. Tartılan kimyasallar manyetik karıştırıcı üzerinde toplam hacimden biraz az saf su ile çözülerek pH' ı 0.1 M NaOH ile 9' a ayarlanır. Hacim saf su ile tamamlanarak erlenlere hacmin 1/10' u olacakşekilde paylaştırılır. Erlenin ağzı pamukla sıkıca kapatılır ve alüminyum folyo sarılarak 121 ºC' de 15 dk otoklavlanır. Hazırlanan besiyeri oda sıcaklığında uzun süre saklanabilir. Kontamine olanlar dökülür.

1.1.2. LB Agar

Alkalifilik, termofilik ve halofilik bakterilerin izolasyonu ve katı agarda stok kültürlerin saklanması için kullanılmıştır (Sambrook ve Russell, 2001).

Bileşimi	g/L
Tripton	10
Maya Ekstraktı	5
NaCl	50
Agar	15

İstenen özellikteki bakteri izolasyonu için NaCl miktarı (% 24) veya pH: 11.5 olarak modifiye edilmiştir.

1.1.2.1. LB-CMC-Agar Besiyeri

CMCaz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanılmıştır (Sambrook ve Russell, 2001).

Bileşimi	**g/L**
Tripton	10
Maya Ekstraktı	5
NaCl	50
Agar	15
CMC(Carboxymethylcellulose)	1

1.1.2.2. LB-Ksilan-Agar Besiyeri

% 24 NaCl içeren LB ortamında üreyen halofilik ksilanaz enziminin aktivitesinin saptanması ve enzim üretimi amacıyla kullanılmıştır (Sambrook ve Russell, 2001).

Bileşimi	**g/L**
Tripton	10
Maya Ekstraktı	5
NaCl	50
Agar	15
Ksilan	1

1.1.2.3. LB-Nişasta-Agar Besiyeri

Amilaz aktivitesinin saptanması ve enzim üretimi amacıyla kullanılmıştır (Sambrook ve Russell, 2001).

Bileşimi	g/L
Tripton	10
Maya Ekstraktı	5
NaCl	50
Agar	15
Nişasta	5

1.1.3. Antibiyogram tesi için kullanılan besi yerleri

LB katı besi yeri + antibiyotik diskleri

EK-2. ÇÖZELTİLER

2.1. NaOH Çözeltisi

Besiyerlerinin pH'sını ayarlamak ve tampon çözeltilerin hazırlanması amacı ile 0.2N ve 2N NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

2.2. Kongo Kırmızısı (%0.1 w/v)

Katı besiyerindeki selülaz ve ksilanaz enzim aktivitesi ile SDS-PAGE jel uygulamasında jeldeki selülaz ve ksilanaz aktivitesinin gösterilmesi için %0.1'lik kongo kırmızısı 100 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır (Voget ve ark, 2006).

2.3. İyodin Boyası (100 ml)

Katı besiyerindeki amilaz enzim aktivitesini ve SDS-PAGE jel uygulamasında jeldeki amilaz aktivitesinin gösterilmesi için kullanılır.

50 ml Metanol

10 gr Potasyum iyodid

1 gr İyodin (iyot)

Yukarıda belirtilen miktarlarda kimyasal malzemeler hazırlanarak bir erlenin içerisine konur. Bir miktar saf su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda iyice çözdürülür. Hacim saf su ile 100 ml' ye tamamlanır.

2.4. NaCl Çözeltisi (1 M)

Petri kabında selülaz ve ksilanaz aktivitesini saptamak ve zimogram analizinde jelde bulunan aktivite bandını görünür hale getirilmesinde kongo kırmızısının uzaklaştırılması amacıyla kullanılmıştır (Voget ve ark, 2006).

2.5. Ethidium Bromid (EtBr) (10 mg/ml)

Hazırlanmak istenen hacim için gereken miktar Ethidium bromid (EtBr) dikkatli bir şekilde tartılır ve saf suda vortekslenerek iyice çözülür. Işığa hassas olduğu için ya koyu renkli bir şişeye konur, veya bulunduğu kap alüminyum folyo ile sarılarak +4 ºC' de muhafaza edilir. Kuvvetli bir mutajen olduğu için tartım ve kullanım sırasında çok dikkatli olunmalı, mutlaka eldiven ve maske kullanılmalıdır.

2.6. Sodyum-Fosfat Tamponu

Enzimlerin pH 6-8 arasındaki aktivitelerini saptamak amacı ile kullanılmıştır. 0.2 M solusyon A (27.8 gr NaH2PO4/1000 ml) ve 0.2 M solusyon B Na2HPO4x7H2O (53.65 gr/1000 ml) stok çözeltileri hazırlanır ve istenilen pH

değerleri için uygun karışımların elde edilmesi amacıyla kullanılır (Temizkan ve Arda, 2004).

2.7. Tris Tamponu

Enzimlerin pH 8.0-11 arasındaki aktivitelerini saptamak amacı ile kullanılır. 100 mM olacak şekilde Tris tartılır ve istenilen pH değerine ulaşana kadar uygun NaOH çözeltisinden (0.2 M NaOH ve yüksek pH değerleri için de 2 N NaOH) eklenir (Temizkan ve Arda, 2004).

2.8. DNS (Dinitro Salisilik Asit)

Enzim aktivitesini durdurmak ve indirgen şeker miktarının saptanması amacı ile kullanılmıştır. 1 g DNS (50 ml' de-iyonize su içinde çözüldükten sonra), 30 g KNa-Tartarat ve 20 ml 2N NaOH ilave edilerek, son hacim distile su ile 100 ml' ye tamamlanır (Miller, 1951).

2.9. TCA (Trikloroasetikasit) (%20 w/v)

20 gr TCA (Trikloroasetikasit) 100 ml' ye tamamlanacak şekilde distile suda çözülür.

2.10. SDS-PAGE Stok Solüsyonları

Stok solüsyonlarının hazırlanığı aşağıda verilmiştir (Bollag ve ark., 1996).

2.10. 1. 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)

İstenen hacimlerde 0.5 M olacak şekilde Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözülür, pH' sı NaOH ile 8.0' a ayarlanarak saf su ile hacme tamamlanır. 121 ºC' de 15 dk otoklav yapılarak +4 ºC' de saklanır.

2.10.2. 2M Tris HCl, pH: 8.8

24.2 gr Tris tartılır, 50 ml distile suda çözülür. Konsantre HCl ile pH:8.8' e ayarlanıp distile suyla 100 ml' ye tamamlanır.

2.10.3. 1M Tris-HCl, pH: 6.8

12.1 gr Tris tartılır, 50 ml distile suda çözülür. Konsantre HCl ile pH:6.8' e ayarlanıp distile suyla 100 ml' ye tamamlanır.

2.10.4. %10 w/v SDS

10 gr SDS tartılıp distile suyla 100 ml' ye tamamlanır.

2.10.5. Akrilamid Solüsyonu (%30 w/v Akrilamid, %0.8 w/v Bisakrilamid)

29.2 gr akrilamid ve 0.8 gr bisakrilamid tartılıp distile su ile 100 mL' ye tamamlanarak çözülür. Buzdolabında kahverengi şişede saklanır (Bollag ve ark., 1996).

2.10.6. %10 w/v Amonyum Persülfat

SDS-PAGE jellerinin hazırlanmasında polimerizasyon başlatıcı olarak kullanılmıştır. 0.5 gr Amonyum Persülfat tartılıp distile suyla 5 mL' ye tamamlanır.

2.10.7. Örnek Yükleme Tamponu (5X)

0.6 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 5 ml Gliserol (% 50), 2 ml % 10 w/v SDS, 0.5 mL β-merkaptoetanol, 1 ml % 1 w/v Bromfenol mavisi ve 0.9 ml distile su karışımından meydana gelir (Bollag ve ark, 1996).

2.10.8. Elektrot Solüsyonu (1 L)

0.05 M Glisin
0.05M Tris-baz
% 0.1 SDS

Yukarıda verilen oranlara göre istenen hacim için gereken miktarlarda malzeme tartılarak bir kaba konur. İstenen hacmin biraz altında saf su ile çözüldükten sonra yine saf su ile hacme tamamlanır. Hazırlanan solüsyon tankın içerisine konularak, jele yüklenen örneklerin elektroforetik olarak yürütülmesinde kullanılır.

2.10.9. Coomasie Brillant Blue Boyası (CBB) Stok Solüsyonu (1 L)

SDS-PAGE jellerinin elektroforezden sonra boyanması ve protein bantlarınıng örünür hale gelmesi amacı ile kullanılmıştır.

Bileşimi

Coomassie blue (% 0.2 w/v)	2 gr
Metanol (% 50 v/v)	450 ml
Glasial asetik asit (% 10 v/v)	100 ml
Saf su	450 ml

Yukarıda verilen miktarlarda malzemeler bir erlen içerisine alınarak manyetik karıştırıcı üzerinde iyice homojenize edilir.

2.10.10. Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu (1 L)

SDS-PAGE jellerin Coomasi Brillant Blue ile boyandıktan sonra jeldeki boya fazlasının geri alınarak bantların netleşmesi amacıyla kullanılmıştır.

Bileşimi	mL
Metanol (% 5 v/v)	100
Glasial asetik asit (% 7 v/v)	100
Distile su	800

Yukarıda verilen miktarlarda malzemeler bir erlen içerisine alınarak manyetik karıştırıcı üzerinde iyice homojenize edilir.

2.10.11. 50 mM Na-fosfat Solüsyonu (pH 7.2)

50 mM Na_2HPO_4
50 mM NaH_2PO_4

İstenen hacim için gereken miktarlarda Na_2HPO_4 ve NaH_2PO_4 tartılarak önce her biri için ayrı ayrı solüsyon hazırlanır. Daha sonra geniş bir kaba her iki solüsyondan dikkatlice aktarılarak birbiri ile pH 7.2' ye ayarlanır. Otoklavlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilir.

EK-3. PROTOKOLLER

3.1. SDS-PAGE' nin Hazırlanması (Laemmli, 1970)

%12' lik toplayıcı jel aşağıda verilen oranlarda kimyasalların ilavesiyle hazırlanmıştır.

Solüsyonlar	**Miktar**
*Akrilamid (%30 w/v)	12 ml
Tris (2 M, pH 8.8)	5.62 ml
SDS (%10 w/v)	0.3 ml
Saf su	12.1 ml

*(% 30 w/v, 30 gr akrilamid, 0.8 gr bisakrilamid tartılarak toplam 100 ml olacak şekilde saf suda çözülür (Akrilamid nörotoksik olduğu için tartarken eldeven ve maske kullanılmalıdır.)

Karışım hazırlandıktan sonra, polimerizasyonu sağlamak için üzerine 200 µl amonyum persülfat (%10 w/v) ve 20 µl TEMED ilave edilerek daha önce hazırlanan iki cam levhadan oluşan düzenek arasındaki boşluğa bir pastör pipeti yardımıyla üstten 4-5 cm boşluk kalacak şekilde dökülmüştür. Üzerine ince bir katman oluşturacak şekilde su ile satüre edilmiş bütanol ve ya sadece saf su ilave edilerek donması için 45 dk beklenmiştir. Jel donduktan sonra üstteki bütanol bir teksir kağıdına emdirilerek alınmıştır. Bu arada aşağıda verilen oranlarda kimyasalların karışımıyla toplayıcı jel bir erlen içerisine hazırlanmıştır:

Solüsyonlar	**Miktar**
Akrilamid (%30 w/v)	1.8 ml
Tris (0.5 M, pH 6.8)	3.65 ml
SDS (%10)	0.15 ml
Saf su	9.4 ml

Polimerizasyonu sağlamak için 100 µl amonyum persülfat (%10 w/v) ve 10 µl TEMED eklenerek bir pipet yardımıyla toplayıcı jelin üzerine dökülmüştür. Jel tarağı yerleştirilerek donması için 45 dakika beklenmiştir. Jel donduktan sonra tarak çıkarılarak yarısına kadar elektrot solüsyonu (0.05 M Glisin, 0.05M Tris-baz, % 0.1 SDS) konmuş olan tankın içerisine kısa cam iç tarafa gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Karşı tarafa iki cam levha yan yana konularak uzun cam iç tarafa gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra iki cam levhanın arasına jelin üzerine çıkacak kadar, dışına ise 2-3 parmak yüksekliğinde elektrot solüsyonu (Ek. 2.10.8.) ilave edilmiştir.

3.2. Hücredışı Proteinlerin TCA Muamelesi İle Elde Edilmesi

1. Bakteri kültürü steril öze yardımıyla 25 ml hacimli LB sıvı besiyerine ekilerek 55 ºC' de 72 saat süreyle üremeye bırakılır.
2. Süre sonunda bakteriler 10 ml hacimli santrifüj tüplerine alınır ve 4500 rpm' de 10 dk süreyle santrifüj edilerek çöktürülür.
3. Üst faz 5' er ml olacakşekilde temiz santrifüj tüplere alınır ve üzerine 1 hacim %20 w/v TCA eklenerek bir pipet yardımıyla yardımı ile homojenize edilir.
4. Elde edilen karışımlar (süpernatant+TCA) 24 saat süreyle oda sıcaklığında inkübe edilir.
5. Süre sonunda örnekler 4500 rpm' de 10 dk süreyle santrifüj edilerek proteinlerin pelet oluşturması sağlanır. Üst sıvı kısım dökülerek uzaklaştırılır.
6. Protein peletleri kurutularak 1 M Tris (pH 8)' de çözülür.

3.3. α-Amilaz Enzimlerinden Sorumlu Bantların SDS-Nişasta-PAGE' de Gösterilmesi

1. jel iki cam levha arasından dikkatlice çıkarılarak renatürasyon solüsyonuna (%80 v/v 50 mM Na-fosfat solüsyonu (pH 7.2) (Ek 2.10.11.), %20 v/v izopropanol) alınır ve bu solüsyon içerisinde 1 saat süreyle inkübe edilir. Böylece SDS jelden uzaklaştırılarak proteinler renatüre edilmiş olur.
2. Jel bu solüsyondan alınarak 50 mM Na-fosfat solüsyonu (pH 7.2) içerisine konur ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir.
3. Daha sonra jel 50 mM Na-fosfat solüsyonu + 5 mM β-merkaptoetanol + 1 mM EDTA' dan oluşan solüsyona alınarak +4 ºC' de gece boyunca inkübe edilir.
4. Ertesi gün jel streç filme sarılarak 55 ºC' de 4 saat inkübe edilir. Böylece sıcaklığa dirençli amilazın ortamdaki nişastayı parçalaması sağlanmış olur.
5. Jel, içinde Coomassie blue (Ek 2.10.9.) boyası bulunan bir kabın içerisine konarak 1 saat süreyle boyanması beklenir.
6. Jel Coomassie blue boyasından uzaklaştırılarak destain (Ek 2.10.10.) solüsyonu bulunan bir kabın içerisine konur ve ertesi güne kadar jel bu solüsyonda bekletilir.

Birkaç defa solüsyon yenilenerek fazla boyanın daha iyi uzaklaşması sağlanır. Böylece bakterilere ait toplam protein bantları görünebilir hale gelir.

7. Fazla boyanın uzaklaştırılmasından sonra jel bu sefer iyodin boyası (Ek 2.3.) ile 5-6 dk boyanarak bakterilere ait amilaz bandı ortaya çıkarılır.

3.4. Lowry Yöntemi

Bu yöntem, fosfomolibdiktungstik asit (Folinciocalteau belirteci) trozin bakiyeleri ile reaksiyona girerek mavi bir renk oluşturması esasına dayanır. Reaksiyon bakır ile protein arasında kompleks oluşumu ile başlar. Alkali çözeltide, oda sıcaklığında 5-10 dakika içinde tamamlanır. Bakırın varlığı yöntemin duyarlığını 3-15 kat artırmaktadır. Protein konsantrasyonun belirlenmesinde standart protein olarak BSA (Bovin Serum Albumin) değişik konsantrasyonlarda stok solüsyonundan (10 mg/ml) uygun miktarlarda kullanılır (Lowry ve ark., 1951).

Çözeltiler

Solüsyon A: (1.5 gr $CuSO_4$ $5H_2O$/100 ml)
Solüsyon B: (3.37 gr Na veya K tartarat/100 ml)
Solüsyon C: (2 gr NaOH, 10 gr Na_2CO_3/500 ml)
Solüsyon D: (100 ml Solüsyon C+1 ml Solüsyon A+1 ml Solüsyon B)
Folin: (1 ml folin+1 ml H_2O)

Yöntem

1. Çalışma aralığına uygun konsantrasyonda (örneğin 20µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl, 100 µl) standartlar (BSA) standart örnek ve protein örnekleri 1’er ml D çözeltisiyle karıştırıldı.
2. Oda sıcaklığında 10’ar dakika beklendi.
3. Hepsinin üzerine 100’er µl Folin eklendi.

4. D çözeltisinin ortama katılması ve homojen bir şekilde karıştırma işlemi 2-3 saniye içinde tamamlanmalıdır. Bunun için eklemenin yapılacağı tüp vorteks üzerinde tutuldu ve tam ekleme esasında hızlı karıştırıldı.
5. 30 dakika karanlıkta bekletildi.
6. 660 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

Standart Eğrinin Oluşturulması

Absise (x eksenine) 1 mg/ml arasında, değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış standart protein çözeltilerinin konsantrasyon değerleri, ordinata da (y eksni) bu çözeltilerin absorbsiyon değerleri yerleştirilerek doğursal bir standart eğri hazırlandı. Ondan sonra konsantrasyonu bilinmeyen örneğin absorbans değerinin bu eğriyi kestiği noktadan x eksenine indirilen bir dikme yardımıyla örneklerin konsantrasyon değerleri bulundu. Konsantrasyon değerlerini bulmak için kullanılacak diğer bir yöntemde regresyon analiz yöntemidir. Bu yönteme göre absorbsiyon değerleri ve protein konsantrasyonları bilinen standart BSA'dan yararlanarak standart regresyon eğrisi oluşturulur. Bu eğrinin y=bx+a şeklindeki formülünden a ve b değerleri tespit edilir. Bundan sonra örneklerin fotometrede okunan absorbsiyon değerleri (y) formülde yerine konularak protein konsantrasyonları bulunur.

3.5. İzolatlara ve Mutant Varyetelere Ait Enzim Aktiviteleri

55 °C'de bir gecede üretilen bakteriler 4950 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Üstte kalan süpertant kısım bakteri ile karıştırılmadan pipetle dikkatlice çekilip hemen buz üzerine alındı. Reaksiyon için; 1 ml enzim 1ml substrat ile karıştırıldı ve bu karışım beş paralel olarak hazırlandı. 1 ml enzim + 1 ml tris (pH9) olmak üzere 4 paralel enzim kontrolü, 1 ml substrat + 1 ml tris (pH9) olmak üzere 4 paralel de substrat kontrolü hazırlandı. Ayrıca kontrol için 2 ml tris içeren bir tüp, diğerleriyle birlikte 30 dakika 55˚C'ye ayarlanmış su banyosunda inkübe edildi. Reaksiyon bitiminde tüplere 3'er ml DNS solüsyonu eklenerek vorteks yapıldı ve 5

dakika kaynar suda bekletildi. Tüpler soğuduktan sonra örneklerin 540 nm dalga boyunda spektrofotometre ile absorbans değerleri belirlendi.

3.6. Bakterilerin Zamana Göre Enzim Aktiviteleri

Bakterilerin üreme periyotlarına göre enzim aktivite seviyelerinin belirlenmesi amacı ile, izolatların LB (pH: 9) sıvı besiyerinde 55 °C' de inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. Her 12 saatte bir (12, 24, 36, 48, 60, 72) 10 ml sıvı besiyerinden alınarak 4950 rpm' de 10 dakika süreyle çöktürülmüş ve hücresiz süpernatant elde edilmiştir. Enzim (1 ml) ve substrat (1 ml %2' lik nişasta ve ksilan ayrı ayrı) karışımı pH 9' da 30 dakika inkübe edildikten sonra örnek karışımına eşit hacimde 3ml DNS eklenerek 5 dakika kaynatma işlemi uygulanmıştır. Soğutulan örnekler 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede değerlendirilmiştir. En yüksek absorbansın elde edildiği zaman değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif aktivite belirlenmiştir.

3.7. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerlerinin Belirlenmesi

Santrifüj ile original ve mutant suşlar çöktürülerek elde edilen enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri pH değerlerinin belirlenmesi için Na-fosfat (pH 6-8) ve tris (pH 7.5-11.0) tamponları kullanılarak farklı pH değerlerine sahip (pH 6.0-11.0) ve içerisinde %2 Nişasta veya ksilan bulunan substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Aktivite tayini için 1 ml enzim ve 1 ml substrat tüpte karıştırılarak enzimin yukarıda belirlenen optimum sıcaklık değerinde 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda enzim substrat karışımına toplam hacim kadar DNS ayıracı eklenerek, 5 dakika kaynar suda kaynatılmış, soğutma işleminden sonra 540nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak, köre karşı absorbans değerleri kaydedilmiştir. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif enzim aktivitesi belirlenmiştir.