

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Vahid DANESH

**HAYVANCILIKTA YEM KATKISI OLARAK KULLANILAN
ENZİMLERİ ÜRETEN YENİ BAKTERİ SUŞLARININ İZOLASYONU
VE KARAKTERİZASYONU**

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2012

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAYVANCILIKTA YEM KATKISI OLARAK KULLANILAN ENZİMLERİ
ÜRETEN YENİ BAKTERİ SUŞLARININ İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

Vahid DANESH

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Bu Tez/....../2012 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Numan ÖZCAN
DANIŞMAN

.....
Yrd. Doç. Dr. B. Devrim ÖZCAN
ÜYE

.....
Yrd. Doç. Dr. Makbule BAYLAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Zootečni Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. M. Rifat ULUSOY
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2011YL30**

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HAYVANCILIKTA YEM KATKISI OLARAK KULLANILAN ENZİMLERİ
ÜRETEN YENİ BAKTERİ SUŞLARININ İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

Vahid DANESH

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

Danışman :Prof. Dr. Numan ÖZCAN

Yıl: 2012, Sayfa: 108

Jüri :Prof. Dr. Numan ÖZCAN

:Yrd. Doç. Dr. B. Devrim ÖZCAN

:Yrd. Doç. Dr. Makbule BAYLAN

Bu çalışmada Van Gölü ve Hazer Denizi su ve toprak numunelerinden α -amilaz ve CMCaz üreten alkalifilik, halofilik ve termofilik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bakterilerin besiyerlerinde üreme ve enzim üretme yetenekleri ve optimum sıcaklık, pH, zamana göre enzim aktivitesi, spesifik aktivite ve substrat spesifisitesi, değerleri belirlenmiştir. Son olarak tüm bakterilerin toplam proteinlerine ait bant profilleri SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Ayrıca enzimlere ait aktivite bantları da zimogram analizi ile gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp., α -amilaz, CMCaz, ekstremofil

ABSTRACT

MSc. THESIS

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NEW BACTERIAL STRAINS WITH PRODUCING FEED ADDITIVE ENZYMES USED IN ANIMAL NUTRITION

Vahid DANESH

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

Supervisor :Prof. Dr. Numan ÖZCAN

Year: 2012, Pages: 108

Jury :Prof. Dr. Numan ÖZCAN

:Assist. Prof. Dr. B. Devrim ÖZCAN

:Assist. Prof. Dr. Makbule BAYLAN

In this study, alkaliphilic, halophilic and thermophilic *Bacillus* sp. strains isolated and characterized from the soil and water samples collected from the Van Lake and Khazar Sea. In this purpose, bacterial growth and enzyme production on plates besides this optimum temperature and pH range, enzyme activity with respect to time, specific activity and substrat specificity values of enzymes have been determined. The protein band profiles of all bacterial strains have been determined by SDS-PAGE. Besides this activity bands of enzymes have been determined by zymogram analysis.

Key words: *Bacillus*, α -amylase, CMCase, extremophile

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmasında bana büyük emeği geçen, beni her konuda yönlendiren ve hiçbir yardımı esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Numan ÖZCAN'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca tez çalışmasının her aşamasında her zaman yanımda olan; yakın ilgisi, değerli önerileri ve yardımlarını benden esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. B. Devrim ÖZCAN ve sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Makbule BAYLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

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

Akademik hayatım süresince her türlü maddi ve manevi yardımlarını benden esirgemeyen babam, annem, ablam ve özellikle kardeşim Farid DANESH'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVI
1. GİRİŞ	1
1.1. Ekstrem Mikroorganizmalar.....	2
1.1.1. Termofil (Sıcak Seven) Mikroorganizmalar	3
1.1.1.1. Termofillerin Yüksek Sıcaklık Direnci	5
1.1.1.2. Termostabil Enzimler	6
1.1.2. Alkalifil Mikroorganizmalar	8
1.1.3. Halofil Mikroorganizmalar	8
1.1.3.1. Halofillerin Biyoteknolojik Potansiyelleri	9
1.2. Yem Katkı Maddeleri.....	10
1.2.1. Enzimler	11
1.2.1.1. Nişasta ve Amilazlar	15
1.2.1.1.(1). Nişastayı Parçalayan Enzimler	16
1.2.1.1.(2). Yem Katkı Maddesi Olarak Amilaz Enziminin	
Kullanımı	19
1.2.1.2. Selüloz ve Selülaz (Glukanaz) Enzimleri.....	19
1.2.1.2.(1). Yem Katkı Maddesi Olarak Selülaz Enziminin	
Kullanımı	22
1.3. <i>Bacillus</i> Türlerinin Genel Özellikleri	23
1.3.2. <i>Bacillus</i> Türlerinin Genetik Yapısı	24
1.4. Araştırmanın Amacı ve Kapsamı	24
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	27
2.1. Amilazla İlgili Yapılmış Önceki Çalışmalar	27

2.2. Selülozla İlgili Yapılmış Önceki Çalışmalar	30
3. MATERYAL VE METOD	33
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Bakteri ve Besiyerler	32
3.1.2. Aletler	33
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	33
3.2. Metod	34
3.2.1. <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının İzolasyonu ve Katı Besiyerlerinde Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	34
3.2.1.1. Toprakta Alkalifilik, Halofilik ve Termofilik <i>Bacillus</i> sp. İzolasyonu	34
3.2.1.2. Katı Besiyerinde Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	35
3.2.1.3. Katı Besiyerinde CMCaz Aktivitesinin Belirlenmesi	35
3.2.2. Enzimlerin Üretimi ve Kantitatif Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	35
3.2.2.1. Enzimlerin Zamana Göre Optimum Aktiviteleri	36
3.2.2.2. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi	36
3.2.2.3. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Belirlenmesi	37
3.2.2.4. İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının Farklı Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	37
3.2.2.5. İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının Spesifik Aktiviteleri	38
3.2.3. Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) .ve Zymogram Analizi	38
3.2.3.1. Hücre dışı Proteinlerin TCA Muamelesi İle Elde Edilmesi	39
3.2.3.2. SDS-PAGE Sisteminin Hazırlanması	39
3.2.3.3. Zimogram Analizi İçin SDS-PAGE Sisteminin Hazırlanması	40
3.2.3.4. Elektrophorez Aletinin Çalıştırılması	40

3.2.3.5. Protein Bantlarının Belirlenmesi.....	41
3.2.3.6. SDS-CMC-PAGE Jelde CMCaz Aktivitesinin Tayini.....	41
3.2.3.7. SDS-Nişasta-PAGE Jelde α -Amilaz Aktivitesinin Tayini.....	42
4. BULGULAR VE TARTIşMA	43
4.1. <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının İzolasyonu.....	43
4.2. Van Gölün'den İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. VA1-29 Suşuna Ait Bulgular	44
4.2.1. <i>Bacillus</i> sp. VA1-29 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler	44
4.2.2. <i>Bacillus</i> sp. VA1-29 Suşu Tarafından Üretilen CMCaz	
Enzimlerin Bazı Enzimatik Özellikleri.....	45
4.2.3. <i>Bacillus</i> sp. VA1-29'un SDS-CMC-PAGE	
ve Zimogram Analizi	46
4.3. Van Gölün'den İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. VA1-30 Suşuna Ait Bulgular	47
4.3.1. <i>Bacillus</i> sp. VA1-30 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler	47
4.3.2. <i>Bacillus</i> sp. VA1-30 Suşu Tarafından Üretilen CMCaz Enziminin	
Bazı Enzimatik Özellikleri.....	48
4.3.3. <i>Bacillus</i> sp. VA1-30'un SDS-CMC-PAGE	
ve Zimogram Analizi	49
4.4. Van Gölün'den İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. VA1-49 Suşuna Ait Bulgular	50
4.4.1. <i>Bacillus</i> sp. VA1-49 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler	50
4.4.2. <i>Bacillus</i> sp. VA1-49 Suşu Tarafından Üretilen CMCaz	
Enziminin Bazı Enzimatik Özellikleri.....	51
4.4.3. <i>Bacillus</i> sp. VA1-49'un SDS-CMC-PAGE	
ve Zimogram Analizi	52
4.5. Van Gölün'den İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. VA1-47 Suşuna Ait Bulgular	53
4.5.1. <i>Bacillus</i> sp. VA1-47 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler	53
4.5.2. <i>Bacillus</i> sp. VA1-47 Suşu Tarafından Üretilen CMCaz	
ve α -Amilaz Enzimlerin Bazı Enzimatik Özellikleri.....	54
4.5.3. <i>Bacillus</i> sp. VA1-47'nin SDS-CMC-PAGE, SDS-Nişasta-PAGE'de	
Zimogram Analizi.....	55
4.6. Van Gölün'den İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. VA1-45 Suşuna Ait Bulgular	56
4.6.1. <i>Bacillus</i> sp. VA1-45 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler	56

4.6.2. <i>Bacillus</i> sp. VA1-45 Suşu Tarafından Üretilen CMCaz ve α -Amilaz Enzimlerin Bazı Enzimatik Özellikleri.....	57
4.6.3. <i>Bacillus</i> sp. VA1-45'in SDS-CMC-PAGE, SDS-Nişasta-PAGE'de Zimogram Analizi.....	58
4.7. Hazar Denizin'den İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. KH1-29 Suşuna Ait Bulgular	59
4.7.1. <i>Bacillus</i> sp. KH1-29 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler	60
4.7.2. <i>Bacillus</i> sp. KH1-29 Suşu Tarafından Üretilen α -Amilaz Enziminin Bazı Enzimatik Özellikleri.....	60
4.7.3. <i>Bacillus</i> sp. KH1-29'un SDS-Nişasta-PAGE ve Zimogram Analizi	61
4.8. Van Gölün'den İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. VA2-34 Suşuna Ait Bulgular	62
4.8.1. <i>Bacillus</i> sp. VA2-34 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler	62
4.8.2. <i>Bacillus</i> sp. VA2-34 Suşu Tarafından Üretilen α -Amilaz Enziminin Bazı Enzimatik Özellikleri.....	63
4.8.3. <i>Bacillus</i> sp. VA2-34'ün SDS-Nişasta-PAGE ve Zimogram Analizi	64
4.9. Van Gölün'den İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. VA2-35 Suşuna Ait Bulgular	65
4.9.1. <i>Bacillus</i> sp. VA2-35 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler	65
4.9.2. <i>Bacillus</i> sp. VA2-35 Suşu Tarafından Üretilen α -Amilaz Enziminin Bazı Enzimatik Özellikleri.....	66
4.9.3. <i>Bacillus</i> sp. VA2-35'in SDS-Nişasta-PAGE ve Zimogram Analizi	67
4.10. Van Gölün'den İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. VA2-41 Suşuna Ait Bulgular	68
4.10.1. <i>Bacillus</i> sp. VA2-41 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler.....	68
4.10.2. <i>Bacillus</i> sp. VA2-41 Suşu Tarafından Üretilen α -Amilaz Enziminin Bazı Enzimatik Özellikleri.....	69
4.10.3. <i>Bacillus</i> sp. VA2-41'in SDS-Nişasta-PAGE ve Zimogram Analizi	70
4.11. İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının Farklı Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması	71

4.12. İzole Edilen <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının Spesifik Aktiviteleri	71
4.13. Tartışma.....	72
4.13.1. CMCaz	72
4.13.2. α -Amilaz	74
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	79
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	97
EKLER.....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Bazı Ekstreofil gruplarca üretilen enzimler ve Uygulama Alanları.....	3
Çizelge 1.2. Termofilik mikroorganizmalara ait bazı enzimlerin endüstriyel uygulamaları.....	7
Çizelge 1.3. Son yıllarda kullanımı yaygılaşan yem katkı maddeleri.....	11
Çizelge 1.4. Yem katkı maddesi olarak kullanılan enzimler.....	14
Çizelge 4.1. İzolasyon sonunda seçilmiş <i>Bacillus sp.</i>	43
Çizelge 4.2. <i>Bacillus sp.</i> VA1-29 Suşuna ait enzim profili.....	44
Çizelge 4.3. <i>Bacillus sp.</i> VA1-30 Suşuna ait enzim profili.....	47
Çizelge 4.4. <i>Bacillus sp.</i> VA1-49 Suşuna ait enzim profili.....	50
Çizelge 4.5. <i>Bacillus sp.</i> VA1-47 Suşuna ait enzim profili.....	53
Çizelge 4.6. <i>Bacillus sp.</i> VA1-45 Suşuna ait enzim profili.....	56
Çizelge 4.7. <i>Bacillus sp.</i> KH1-29 Suşuna ait enzim profili.....	59
Çizelge 4.8. <i>Bacillus sp.</i> VA2-34 Suşuna ait enzim profili.....	62
Çizelge 4.9. <i>Bacillus sp.</i> VA2-35 Suşuna ait enzim profili.....	65
Çizelge 4.10. <i>Bacillus sp.</i> VA2-35 Suşuna ait enzim profili.....	68
Çizelge 5.1. Suşlara ait bütün enzimatik analizler sonucu.....	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Bakteri gelişimi ile sıcaklık ilişkisi	4
Şekil 1.2. Mikroorganizmaların gelişebildikleri pH aralıklarına göre sınıflandırılması	8
Şekil 1.3. Enzim-molekül mekanizmasının görünümü	12
Şekil 1.4. Amiloz ve amilopektin glukoz polimerleri	16
Şekil 1.5. Amilolitik enzimlerin nişastayı hidrolizi ve açığa çıkardıkları ürünler	18
Şekil 1.6. Selülozların selülozu hidroliz mekanizması.....	21
Şekil 1.7. Selülozun selulazlar yardımıyla glukozu kadar parçalanması	22
Şekil 1.8. Bazı <i>Bacillus</i> türlerine ait koloni şekilleri.....	24
Şekil 3.1. LB (Luria-Bertani) besiyerlerinde bakterilerin aerobik koşullarda üretilmesi.....	34
Şekil 3.2. Bakterilere ait toplam proteinlerin SDS-PAGE’de elektroforezi.....	41
Şekil 4.1. <i>Bacillus</i> sp. VA1-29 izolatının LB/CMC/Agar’da CMCaz enzim aktivitesi	44
Şekil 4.2. <i>Bacillus</i> sp. VA1-29 suşu tarafından üretilen CMCaz enzimine ait bazı özellikler	46
Şekil 4.3. <i>Bacillus</i> sp. VA1-29 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü.	46
Şekil 4.4. <i>Bacillus</i> sp. VA1-30 izolatının LB/CMC/Agar’da CMCaz enzim aktivitesi	47
Şekil 4.5. <i>Bacillus</i> sp. VA1-30 suşu tarafından üretilen CMCaz enzimine ait bazı özellikler	49
Şekil 4.6. <i>Bacillus</i> sp. VA1-30 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü	49
Şekil 4.7. <i>Bacillus</i> sp. VA1-49 izolatının LB/CMC/Agar’da CMCaz enzim aktivitesi	50
Şekil 4.8. <i>Bacillus</i> sp. VA1-49 suşu tarafından üretilen CMCaz enzimine ait bazı özellikler	52

Şekil 4.9. <i>Bacillus</i> sp. VA1-49 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü	52
Şekil 4.10. <i>Bacillus</i> sp. VA1-47 izolatının LB/Nişasta/Agar (a) ve LB/CMC/Agar (b)'da α -Amilaz ve CMCaz enzim aktiviteleri	53
Şekil 4.11. <i>Bacillus</i> sp. VA1-47 suşu tarafından üretilen CMCaz ve α -amilaz enzimlerine ait bazı özellikler	55
Şekil 4.12. <i>Bacillus</i> sp. VA1-47 suşuna ait CMCaz ve α -amilaz Enzimlerinin SDS-PAGE ve zimogram analiz görüntüsü	54
Şekil 4.13. <i>Bacillus</i> sp. VA1-45 izolatının LB/Nişasta/Agar (a) ve LB/CMC/Agar (b)'da α -amilaz ve CMCaz enzim aktiviteleri	56
Şekil 4.14. <i>Bacillus</i> sp. VA1-45 suşu tarafından üretilen CMCaz ve α -amilaz enzimlerine ait bazı özellikler	58
Şekil 4.15. <i>Bacillus</i> sp. VA1-45 suşuna ait CMCaz ve α -amilaz Enzimlerinin SDS-PAGE ve zimogram analiz görüntüsü	58
Şekil 4.16. <i>Bacillus</i> sp. KH1-29 izolat tarafından üretilen α -amilaz enziminin LB-Nişasta-Agar'da iyodin boyaması ile gösterilmesi.	59
Şekil 4.17. <i>Bacillus</i> sp. KH1-29 suşu tarafından üretilen α -amilaz enzimine ait bazı özellikler.....	61
Şekil 4.18. <i>Bacillus</i> sp. KH1-29 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü	61
Şekil 4.19. <i>Bacillus</i> sp. VA2-34 izolatı tarafından üretilen α -amilaz enziminin LB-Nişasta-Agar'da iyodin boyaması ile gösterilmesi aktivitesi	62
Şekil 4.20. <i>Bacillus</i> sp. VA2-34 suşu tarafından üretilen α -amilaz enzimine ait bazı özellikler	64
Şekil 4.21. <i>Bacillus</i> sp. VA2-34 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü	64
Şekil 4.22. <i>Bacillus</i> sp. VA2-35 izolatı tarafından üretilen α -amilaz enziminin LB-Nişasta-Agar'da iyodin boyaması ile gösterilmesi aktivitesi	65
Şekil 4.23. <i>Bacillus</i> sp. VA2-35 suşu tarafından üretilen α -amilaz enzimine ait bazı özellikler	67

Şekil 4.24. <i>Bacillus</i> sp. VA2-35 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü	67
Şekil 4.25. <i>Bacillus</i> sp. VA2-41 izolatı tarafından üretilen α -amilaz enziminin LB-Nişasta-Agar'da iyodin boyaması ile gösterilmesi aktivitesi.	68
Şekil 4.26. <i>Bacillus</i> sp. VA2-41 suşu tarafından üretilen α -amilaz enzimine ait bazı özellikler.	70
Şekil 4.27. <i>Bacillus</i> sp. VA2-41 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü.	70
Şekil 4.28. İzole edilen <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının farklı enzim aktivitelerinin karşılaştırılması	71
Şekil 4.29. <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının spesifik aktiviteleri	71

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
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

Biyoteknoloji hayvansal üretimde geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Özellikle besin değeri iyileştirilmiş yem hammaddeleri ile hayvanların performansının artırılması, birim hayvandan elde edilen ürün miktarının artırılması ve hayvan sağlığının iyileştirilmesi biyoteknolojik uygulamaların ana hedefleri olmuştur. Enzimlerin hayvan beslemede kullanılmaya başlanması ile yem hammaddelerinin başta kanatlılar olmak üzere çiftlik hayvanları tarafından sindirilebilirliği artmış, yem maliyeti azalmış ve doğaya daha az atık salınımı sağlanmıştır (Bonneau ve Laarveld, 1999).

Hayvanlarda yemden yararlanma yeteneğini arttırmak amacıyla uygulanan yöntemlerden birisi yemlerin sindirilme derecelerinin artırılmasıdır. Bu amaçla enzimler son yıllarda, çeşitli ülkelerde yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Enzimler, canlı hücreler tarafından üretilen ve spesifik biyokimyasal reaksiyonlarda görev yapan biyokatalizörlerdir.

Enzimler sindirim sisteminde nişasta, protein ve yağları parçalayarak sindirimi kolaylaştırmaktadırlar. Yem katkı maddesi olarak kullanılan enzimler çoğunlukla mantar ve bakteri kökenlidirler. Bunlardan proteaz, glukanaaz, selüloz, pektinaz, amilaz, fitaz ve lipaz gibi çeşitli enzimler tek başına veya kombine olarak karma yemlere katılmak suretiyle yem sanayinde kullanılmaktadır (Karademir ve Karademir, 2003). Yemlere enzim ilavesiyle hayvanların yeterince veya hiç salgılayamadıkları enzimler sağlanarak, yemlerdeki sindirimi güç yapısal karbonhidrat unsurları ile diğer organik ve inorganik unsurlardan daha iyi yararlanılması, istenilmeyen kimi maddelerin etkisiz hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Çiftlik hayvanlarında kullanılan enzim preparatları başlıca *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, ve *Streptococcus faecium* bakterileri, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus oryzae* ve *Trichoderma reesei* mantarları ile *Saccharomyces cerevisiae* mayasından elde edilir (McAllister ve ark., 2001). Bu mikrobiyal enzimlerin aktivitelerini başta sindirim kanalının pH'sı olmak üzere sıcaklık, rutubet, ilave edildiği yemin

kompozisyonu, verildiği hayvanın yaşı ve türü gibi faktörler etkilemektedir. Yem katkısı olarak kullanılan enzimler genellikle ince bağırsak koşullarında (pH 5,5 –7,0) yüksek aktiviteye sahiptir (Diler, 2007).

1.1. Ekstrem Mikroorganizmalar

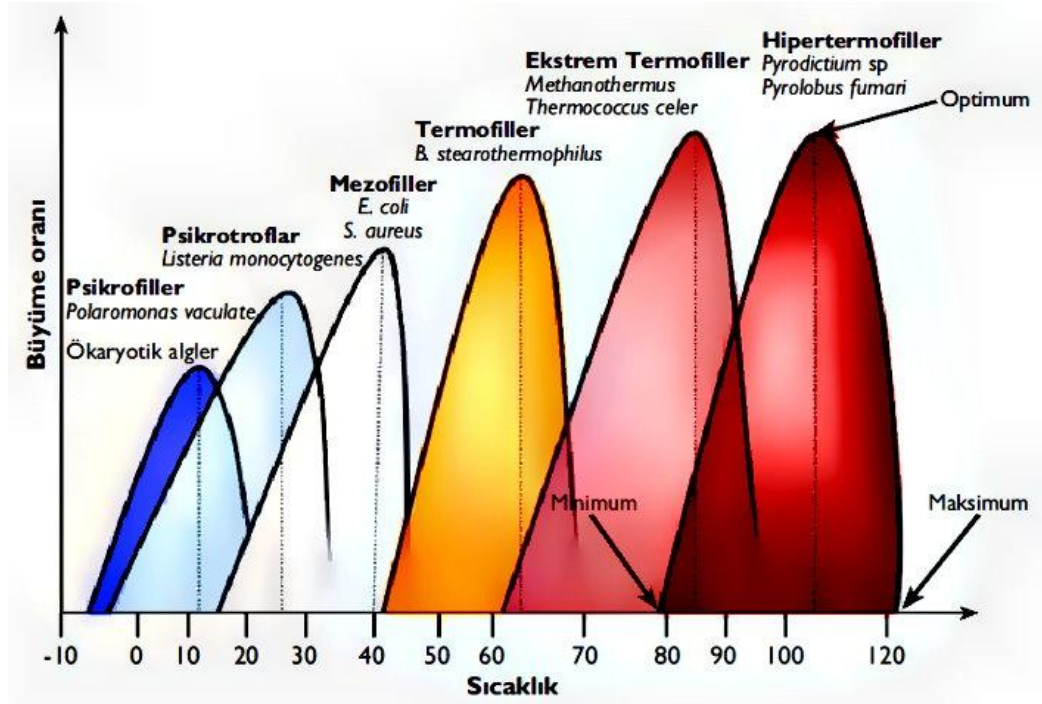
Gelişmeleri için ekstrem çevre koşullarına gereksinim duyan mikroorganizmalar ekstremofiller ve bu mikroorganizmalarca üretilen enzimler ekstremozimler olarak adlandırılmaktadır. Ekstremofiller, diğer bir çok mikroorganizmanın yaşayamayacağı ortamlarda gelişebilen mikroorganizmalardır. Ekstrem çevre koşulları; çok yüksek (55- 121 °C) ya da çok düşük (-2-20 °C) sıcaklık, yüksek tuzluluk (2-5 M NaCl) ve çok yüksek alkali (pH > 8) ya da çok yüksek asitli (pH < 4) koşullardır. Çeşitli ekstremofiller, yüksek basınç, yüksek radyasyon ya da toksik bileşik içeren ortamlarda, yeryüzünden çok derinde bulunan kayalarda ya da su seviyesi ve besin miktarı çok düşük olan kuru ortamlarda yaşamlarını sürdürebilen mikroorganizmalardır (Madigan ve Marrs, 1997; Rothschild ve Manicini, 2001). Ekstremofiller bu zor şartlara yapısal ve moleküler düzeyde adapte olmuşlardır. Ekstremofil mikroorganizmalar yaşadıkları çevre koşullarına göre; termofiller (thermophiles), halofiller (halophiles), psikrofiller (psychrophiles), barofiller (barophiles), alkalifiller (alkaliphiles), metalofiller (metalophiles) ve asidofiller (acidophiles) gibi isimlerle ifade edilmektedirler. Bazı ekstremozimler ve uygulama alanları Çizelge 1.1.'de verilmiştir (Demirjian ve ark., 2001).

Çizelge 1.1. Bazı ekstremofil gruplarca üretilen enzimler 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

1.1.1. Termofil (Sıcak Seven) Mikroorganizmalar

Termofil organizmalar termotolerant veya termofil, hipertermofil ve ekstrem termofil olmak üzere üç grup içerisinde sınıflandırılmaktadırlar (Şekil 1.1). 60-115°C arasında yaşayan organizmalar genel olarak termofil şeklinde adlandırılırlar. 80 °C veya daha yüksek sıcaklıklarda yaşayan organizmalar hiper termofil olarak tanımlanırken, 60-80°C arası ekstrem termofil, 50-60°C arası termofil veya termotolerant şeklinde sınıflandırılmaktadır (Arikan ve ark., 2003).



Şekil 1.1. Bakteri gelişimi ile sıcaklık ilişkisi (Anonymous, 2012a)

Son yıllarda yapılan bir çok çalışmada, ekstremofil mikroorganizmalar içinde en çok termofilik bakteriler dikkat çekmektedir ve bunların biyokatalitik potansiyelleri ve enzimleri üzerinde birçok araştırma yapılmıştır (Gomes ve Steiner, 2004). Termofilik mikroorganizmaların mezofilik mikroorganizmalara göre, yüksek üreme hızları, son ürünün kolay kazanılması, yüksek işleme stabilitesi ve verimi, nişasta ve selüloz gibi doğal polimerleri doğrudan fermente edebilmeleri gibi önemli avantajları vardır. Yüksek sıcaklıklarda (60-110 °C) gelişebilen termofilik mikroorganizmalar, volkanik ve jeotermal kaynaklar örneğin, solfatarik alanlar (yanardağların püskürmesi sırasında başlangıcı gösteren gaz tütme bölgeleri), nötral sıcak su kaynakları ve deniz dibi sıcak su kaynakları v.b. yüksek sıcaklığa sahip deniz ve karasal ortamlarında doğal olarak bulunurlar. 50-60 °C arasındaki sıcaklıklarda optimum olarak çoğalabilen bu mikroorganizmalar ılımlı termofiller olup, bu mikroorganizmaların bir çoğu; fungi, protozoa, alg, Streptomyces ve Cyanobacter gibi çeşitli prokaryotik ve ökaryotik taksonomik gruplara dahildirler. 60-80 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilen ekstrem termofiller genellikle *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Fervidobacterium*, *Thermotoga* ve

Aquifex cinslerine aittirler. 80-110 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilen hipertermofiller; *Aquifex* ve *Thermotoga* cinsi bakteriler ile arke bakterilerden; *Desulfurococcus*, *Sulfolobus*, *Pyrodictium*, *Pyrobaculum*, *Thermoproteus*, *Methanopyrus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Methanococcus* ve *Archaeoglobus*'u içermektedir. Bazı termofil aerobik ve anaerobik sporlu bakteriler, 1940'lardan önce sıcak karasal ortamlarından izole edilmişlerdir (Brock, 1986).

Yaklaşık 20 yıl önce, termal kaynaklardan spor oluşturmayan aerobik bakteriler elde edilmiştir ve ilk termofil organizma olan ve 80 °C'de optimum gelişme gösteren *Sulfolobus acidocaldarius* (arke bakteri) izole edilmiştir (Brock ve ark., 1972). İlk olarak tanımlanan, spor oluşturmayan termofil anaerob bakteri *Methanobacterium thermoautotrophicum*'dur (Zeikus ve Wolfe, 1972).

Anaerobik termofiller, aerobik termofillere göre daha çok çeşitlilik göstermektedir ve ekstrem yüksek sıcaklıklarda geliştirilmeleri daha kolaydır. Zorunlu anaerobik mikroorganizmalar yüksek tuz konsantrasyonu ve düşük pH'da adaptasyon göstermektedirler (Lowe ve ark., 1993). Düşük sıcaklıklarda aktivitelerini devam ettirebilen enzimler psikrofilik enzimlerdir ve çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Termofilik enzimler ise proteazlara, deterjanlara ve organik çözücülerin etkilerine karşı dayanıklıdırlar (Sellek ve Chaudhuri, 1999).

1.1.1.1. Termofillerin Yüksek Sıcaklık Direnci

Mikroorganizmalar, diğer tüm canlılar gibi yaşamak zorunda oldukları ortama uyum sağlar ve yaşamlarını sürdürürler. Termofil mikroorganizmaların diğer canlılar gibi aynı enzimleri içerdikleri ancak bunların enzimlerinin daha termostabil, proteoliz ve denatürasyona dayanıklı olduğu anlaşılmıştır (Kumar ve Nussinov, 2001). Termofillerin hücre membranlarındaki doymuş yağ asitlerinin oranının fazla olduğu, yağ asitlerinin hücre için hidrofobik bir ortam oluşturduğu ve yüksek sıcaklıklarda yaşayabilmek için hücreyi daha dayanıklı hale getirdikleri anlaşılmıştır (Herbert ve Sharp, 1992).

Bir çok hipertermofilik bakteri içeren arkelerin hücre duvarlarında eter bağı ile bağlanmış yağ asitleri bulunmakta, bu yapı doymuş yağ asitleri içeren

membranlara göre daha yüksek sıcaklıklarda bile bozulmadan kalabilmektedir (De rosa ve ark., 1994). Termofillerin DNA'larının pozitif süper sarmallar oluşturan ters DNA giraz içerdiği ve bu yapının, DNA'nın erime noktasını yükselttiği ve böylece mikroorganizmayı daha yüksek sıcaklıklara dayanıklı hale getirdiği saptanmıştır. Termofillerin ayrıca, disülfid bağları ve hidrofobik etkileşimler ile sıcaklığa dayanıklı hale gelebildiği belirlenmiştir (Lopez, 1999; Kumar ve Nussinov, 2001).

Hipertermofilik bakteriler optimum olarak 80-110 °C arasında gelişirler. Bu organizmalar tarafından sentezlenen enzimlerin (hipertermofilik enzimler) yapısal ve fonksiyonel özellikleri yüksek sıcaklıklara dayanabilecek şekilde gelişmiştir ve bu enzimler 70 °C'nin üzerinde optimum bir aktiviteye sahiptirler. Hatta bu enzimlerin bazıları 110 °C'nin üzerinde dahi aktivite gösterebilmektedirler. Bunun yanı sıra termofilik bakteriler ise genellikle 50-80 °C arasında gelişim göstermekte olup bu organizmalarca sentezlenen enzimler mezofilik ve hipertermofilik enzimler arasında bir sıcaklık direnci gösterirler. Bu enzimlerin optimum sıcaklık aktivitesi 60-80 °C'dir. Gerek hipertermofilik, gerekse termofilik enzimler tipik olarak 40 °C'nin altında etkin bir aktivite gösteremezler (Vieille ve Zeikus, 1996; Burg, 2003; Gomes ve Steiner, 2004).

1.1.1.2. Termostabil Enzimler

Termofilik organizmalardan elde edilen enzimler, termostabilitesi yüksek enzimler olacaktır. Termostabil enzimler, genellikle sıcak su ortamları ya da sıra dışı karasal ortamlarda yaşama uyum sağlamış bakteri ya da arkea türlerinden izole edilmektedir. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvan kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır (Wiseman,1987). Ayrıca termostabil enzimlerin endüstriyel işlemlerde kullanılmaları ile yüksek sıcaklıkta bakteriyel ve viral kontaminasyon riski de azaltılmış olur. Termostabil proteinler değişik denatüre edici şartlara karşı yüksek tolerans gösterirler. Bu proteinler

mezofilik proteinlere nazaran daha yüksek α heliks ve β tabakası içeriğine sahiptirler. Ayrıca bu proteinler çok yavaş katlanma hızı gösterirler. Bu özelliğin değişik denatüre edici şartlara karşı doğal yapıyı korumada önemli olduğu sanılmaktadır. Termostabil enzimler biyolojik olarak oldukça güç bir şekilde parçalanabilen ve çözünmeyen çevresel kirleticilerin oluşumunu da engeller (Fujiwara, 2002).

Termostabil proteinlerin sıcaklığa dayanıklılık stratejileri mevcuttur. Termostabil proteinler ve mezofilik olanları benzer sekonder ve tersiyer yapılarına sahiptir. Termostabil ve mezofilik proteinler arasındaki birçok karşılaştırmalı analizler aminoasit içeriklerinin ve yan zincir etkileşimlerinin az oranda fakat açık bir şekilde farklı olduğunu göstermektedir. Termostabil proteinler çok sayıda yüklü ve hidrofobik aminoasitleri ihtiva eder (Fujiwara, 2002).

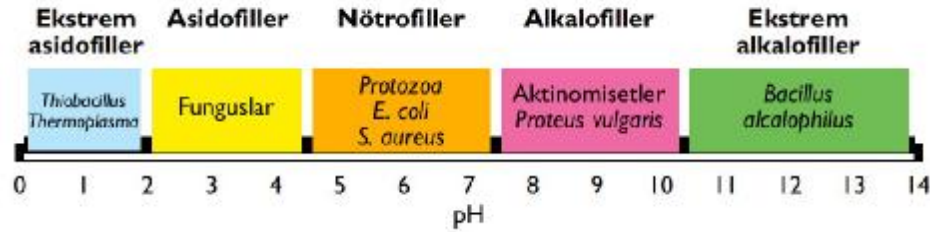
Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar (monosakkaritler, disakkaritler ve polisakkaritler), %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbohidrazlar grubuna giren α -amilaz üretimi %13 ile önemli bir yer tutmaktadır (Wiseman, 1987). Ağırlıklı olarak çalışılan ekstrem termofilik ve hipertermofilik arkea ve bakterilerden elde edilen biyoteknolojik açıdan öneme sahip termostabil enzimler Çizelge 1.2. 'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Termofilik mikroorganizmalara ait bazı enzimlerin endüstriyel uygulamaları (Demirjian ve ark., 2001)

Mikroorganizma	Enzimler	Uygulama
Ilımlı termofiller (50-60°C)	Amilazlar Ksilanaz	Tatlandırıcılar için glukoz, fruktoz hidrolizi Kağıt beyazlatma
Termofiller (60-80 °C)	Beta-galaktozidaz Proteazlar	Süt ve süt ürünlerinde laktoz hidrolizi Ekmekçilik Deterjan sanayisi
Hipertermofiller (<80 °C)	DNA polimerazlar	Genetik mühendisliği

1.1.2. Alkalifil Mikroorganizmalar

Alkalifiller, alkalifiller ve haloalkalifiller olarak 2 gruba ayrılırlar. Alkalifillerin pH'larının 9.0 veya daha yukarıda olması gerekmektedir. Doğada ekstrem çevrelerde alkalifilik mikroorganizmalar, nötrofilik mikroorganizmalar ile bir arada bulunurlar. Alkalifil mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılan besiyerlerinin bazik (alkali) olması gerekir. 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. Haloalkalifiller çoğu dikkate değer örnekler, soda çölleri ve soda gölleri gibi alkali çevrelerde görülmektedir (Horikoshi, 1999). Mikroorganizmalar değişik pH aralığına göre Şekil 1.2 olduğu gibi sınıflandırılabilir.



Şekil 1.2. Mikroorganizmaların gelişebildikleri pH aralıklarına göre sınıflandırılması (Anonymous, 2012a)

1.1.3. Halofil Mikroorganizmalar

Halofilik kelimesi; halo, yunanca tuz, phil ise seven, arkadaş anlamına gelmektedir. Halofilik proteinlerin aktivite, kararlılık veya çözünürlük için ortamda en az 2.5 M NaCl'a gereksinimi vardır. Tuza toleranslı protein üreten 3 tip halofilik organizma tanımlanmıştır. Bunlar sırası ile;

- 1- Aerobik halofil arkea
- 2- Anaerobik halofil metajenik arkea
- 3- Halofil bacteria

Bu mikroorganizmalar sitoplazmalarında neredeyse doyma derecesine yaklaşan oranlarda KCl içerir (Madern ve Ebel, 2000).

Ekstremofilik mikroorganizmaların, yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan üyeleri olan halofiller üç domainde de (Archaea, Bacteria, Eukarya) yer almaktadır. Horikoshi ve Grant, (1998) ve Kushner (1978)'e göre; halofilik olmayanlar (0-1 M), az halofiller (0,2-2,0 M), ılımlı halofiller (0,4-3,5 M), ekstreme yakın halofiller (1,4-4,0 M), ekstremler halofiller (2,0-5,2 M), halotolerantlar (0->1 M) ve değişken halofiller (0->3 M) olarak sınıflandırılmışlardır.

Halofilik mikroorganizmalar tuzlalar, hipersalin göl gibi bölgelerde bulunurlar. Bu ortamlarda, *Dunaliella* (%10 w/v), *Artemia salina*, *Ephydra* gibi ökaryotik organizmalar da yer alır. Bakteriler içerisinde ise %15 w/v tuz konsantrasyonunun altında büyüemeyen *Salinibacter ruber* son yıllarda en ekstrem halofilik bakteri olarak tanılanmıştır (Horikoshi ve Grant, 1998). *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* gibi genuslar ise Archaea domaininde yer alır ve bunlar tuzun çökme noktasına yakın konsantrasyonlarda yaşayabilirler (Horikoshi ve Grant, 1998).

Ekstremler halofilik mikroorganizmalar biyolojik tuza toleranslılığın model organizmalarıdır ve farklı sıcaklık, tuz konsantrasyonlarında optimum aktivite gösteren proteaz, lipaz, amilaz, DNaz, esteraz, selüloz, pullulanaz ve ksilanaz gibi hidrolitik enzim kaynaklarıdır. Halofilik mikroorganizmaların izolasyonları diğer ekstremofilik türlere göre daha kolaydır. Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip düşük miktarda organik madde içeren ortamlar ve aerobik, ılıman sıcaklık (40°C) izolasyon için yeterlidir (Dyall-Smith, 2008) .

1.1.3.1. Halofillerin Biyoteknolojik Potansiyelleri

Ekstremofiller genellikle biyoteknolojik potansiyeli olan bir grup olarak uzun zamandır çalışılmaktadır. Bu grubun bir üyesi olarak halofiller diğer ekstremofillere göre kültürasyonunun kolaylığı açısından ve aspetik koşullara gereksinimlerinin daha az olması açısından önemli avantajlara sahiptir. Halotolerant veya halofilik mikroorganizmalar biyoteknolojinin çeşitli alanlarda potansiyel uygulamalara

sahiptir. Bakteriyorodopsinin teknik uygulamalarının bazıları holografik depo materyali, uzaysal ışık modülatörleri, optic hesaplama ve optic hafıza olarak kullanımıdır. Biyosürefektanlar ve ekzopolisakkaritler petrolün mikrobiyolojik geri kazanımı konusunda ilgi görmektedir. Diğer kullanışı biyomalzemeler enzimlerdir. örneğin; yüksek tuzda aktif olan yeni izomerazlar ve hidrolazlardır (Margesin ve Schinner, 2001).

Diğer ekstermofillere nazaran daha kolay kültüre edilebilmeleri, aseptik koşullara olan ihtiyacın az olması halofilleri çok çalışan ekstremofilik bir grup olarak ortaya çıkarmaktadır. Ekstremofillere alınan patentlerin %20'si halofillerle ilgilidir (Horikoshi ve Grant, 1998). Laboratuar kullanımı açısından halofilik arkea *Halococcus* cinsine ait bir türden elde edilen restriksiyon enzimine dair patent alınmıştır. Çoğu halofilik arkealar yüksek miktarda tuzlu ortamda aktivite gösteren amilaz, amiloglukozidaz, proteaz ve lipaz gibi ekzoenzim üretir. Böyle enzimler ise yüksek tuz içeren ortamlarda parçalanması gereken makromoleküller için bir kullanım alanı oluşturur (Oren, 2002). Geçtiğimiz yıllar içerisinde biyoteknoloji endüstrisinde halofil enzimlerinden endonükleazlar hariç diğer enzimler pek ilgi görmemiştir. Halofil enzimleri daha çok bilimsel çalışmalarda gen kaynağı olarak kullanılmış ve enzim ile ilgili genler değişik vektörlerde eksprese edilerek yapı ve fonksiyon ilişkileri incelenmesinde kullanılmıştır (Horikoshi ve Grant, 1998).

1.2. Yem Katkı Maddeleri

Tüm dünyada hayvan beslemede kullanılan yemlere çeşitli amaçlarla bir çok katkı maddesi katılmaktadır. Kendileri tek başına bir yem olarak kabul edilmeyen bu maddeler, et-süt ve yumurta verimleriyle yem tüketimi ve yemden yararlanmayı arttırmanın yanında, yemin tadını iyileştirme, yemin peletlenmesini kolaylaştırma, yemlerin ve ürünlerin kalitesini iyileştirme gibi bir çok yararlar sağlar. Yem katkı maddelerinin bir kısmı doğal ve zararsız olmasına karşın, çoğu sentetik kimyasallardan oluşur ve dikkatli kullanılmazlarsa, hayvanlarda ve hayvansal ürünleri tüketen insanlarda ciddi sağlık sorunları yaratabilir.

Yem katkı maddeleri;

- Yemden yararlanmayı artırmak,
- Elde edilen hayvansal ürünlerinin miktar ve kalitesini yükseltmek,
- Hayvanları sağlıklı tutmak ve

Elde edilen ürünün birim maliyetini daha düşük düzeye indirmek amacıyla kullanılan maddelerdir (Erkek ve ark., 1996; Yalçın ve ark., 1996).

Uygulamalarda kullanılan yeni alternatif katkı maddeleri enzimler, organik asitler, probiyotikler, oligosakkaritler ve bitki ekstraktlarıdır. Bu katkı maddelerinin etki mekanizmaları Çizelge 1.3.'de verilmiştir.

Çizelge 1.3. Son yıllarda kullanımı yaygılaşan yem katkı maddeleri

Katkı maddesi	Etki mekanizması
Enzimler	Polisakkaritleri anti-besleme etkilerini elimine etmek
Probiyotikler	Gastro-intestinal sistemde mikroflorayı düzenlemek
Organik asitler	Bakteri gelişimini inhibe etmek
Oligosakkaritler	Gastro-intestinal sistemde mikroflorayı düzenlemek
Bitki ekstraktları	Bakteriostatik etki, bağışıklık sistemini güçlendirici etki

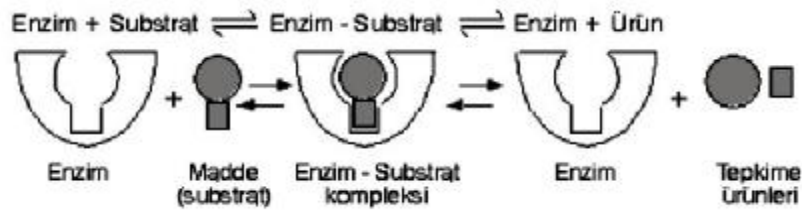
1.2.1. Enzimler

Enzimler, karbon, oksijen, hidrojen ve azottan oluşan, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden, biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleridirler. Biyolojik katalizörler olarak da tanımlanan enzimler, besleyici moleküllerin yıkıldığı, kimyasal enerjinin depolandığı ve şeklinin değiştirildiği, basit prekürsörlerden biyolojik makromoleküllerin yapıldığı metabolik yollarda yüzlerce reaksiyon basamağını katalize ederler. Enzimler katalizör olarak, kimyasal reaksiyonları hızlandırmada ve bir molekülü diğer bir moleküle dönüştürmede kullanılır. Bu işlevi enzim kendisi değişikliğe uğramadan yerine getirir (Karademir ve ark., 2002; Nelson ve Cox, 2004).

Enzimlerin bazıları basit proteinlerdir. Bunların katalitik etki gösteren kısımları doğrudan doğruya proteinin polipeptid zinciridir. Bazı enzimlerin ise katalitik etki gösterebilmeleri için proteinden başka metal iyonuna; bazılarının protein olmayan organik bileşiğe, bazılarının da hem metal iyonuna hem de organik bileşiğe ihtiyaçları vardır. Bu iyon ve bileşiklere genel olarak kofaktör denir (Ziyan, 1998).

Enzimin etki gösterdiği maddeye ‘substrat’ adı verilir ve enzimin adlandırılmaları etkilediği maddenin isminin sonuna –az (-ase) eki getirilerek yapılır. Bütün enzimlerin şifresi genler üzerindedir. Dolayısıyla amino asit dizilimi kendine özgüdür. Doğada her metabolik reaksiyon enzimler tarafından kontrol edilir. Enzim reaksiyon sırasında değişikliğe uğramadan yapısını korur ve başka bir substrat ile tekrar reaksiyona girer. Kimyasal katalizör maddelerin büyük çoğunluğu birçok reaksiyonu katalizleyebilir.

Bir enzim molekülü genel anlamda globüler yapıda bulunur ve molekül içi veya arası bağlar ile sekonder ya da tersiyer yapıda tutulur. Proteinlerin bu yapıları sıcaklık ve pH’daki değişimler ile bozulabilir. Bu yüzden, bir enzimin katalitik aktivitesi pH ve sıcaklığa duyarlıdır. Sıcaklığın yükselmesi, reaksiyona girecek moleküllerin kinetik enerji ile yüklenmesini sağlar. Böylece etkileşime girecek moleküllerin reaksiyon için karşılaşma şansını artırır. Enzim molekülünün mekanizması Şekil 1.3. ’de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Enzim-molekül mekanizmasının görünümü

Her enzimin katalitik aktivitesinin en yüksek seviyede olduğu bir sıcaklık değeri vardır. Buna optimal sıcaklık denir. Bu değerden yüksek sıcaklıklarda enzim yapısı molekül içi veya arası bağların kopması sonucu bozulmaya başlar. Aynı

zamanda her enzimin en iyi çalıştığı bir pH aralığı (optimum pH) mevcuttur. Bu, enzimin molekül yapısının pH'daki değişime bağlı olarak etkilenmesinden kaynaklanmaktadır (Aehle, 2004).

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler proteindirler. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarının bütünlüğüne bağlıdır; bir enzim denatüre edilirse veya alt ünitelerine ayrıştırılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur; bir enzim amino asit komponentlerine yıkılırsa katalitik aktivitesi daima bozulur. Bu nedenle enzim proteinlerinin primer, sekonder, tersiyer ve kuartern yapıları, katalitik aktiviteleri için esastır. Enzimler, diğer proteinler gibi 12.000'den 1.000.000 üzerine kadar değişen moleküler ağırlığa sahiptirler (Nelson ve Cox, 2004).

Enzimlerin yem katkı maddesi olarak kullanılmasıyla, hayvanların yeterince veya hiç salgılayamadıkları enzimlerin sağlanarak yemlerin sindirilme derecelerinin artırılması, sindirimi güç olan ham selüloz ile diğer organik ve inorganik besin maddelerinden daha iyi yararlanılması amaçlanmaktadır (Demirel ve Gürbüz, 1999).

Enzimler proteini, nişasta ve yağları parçalayıp sindirimini kolaylaştırır. Yem katkı maddesi olarak genellikle mantar ve bakteri kökenli enzimler kullanılmaktadır. Enzim preparatı olarak proteaz, glukanaaz, selüloz, pektinaz, amilaz, fitaz ve lipaz gibi çeşitli enzimlerin karma yemlere tek bir tanesi ilave edilebildiği gibi birkaçının katılması da mümkündür. Enzimlerin yemlerin sindirilme derecelerini, metabolik enerji değerlerini artırarak bu sayede yemden yararlanmayı artırdıkları yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Sevgili ve Özen, 1999). Yem katkı maddesi olarak kullanılan enzimler, substratları ve etkileri Çizelge 1.4. 'de verilmiştir.

Çizelge 1.4. 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 artırır; 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 artırır.
Fitaz	Fitik asit	Bitkisel fosfattan yararlanmayı artırır

Mikrobiyal enzimlerin aktivitelerini başta sindirim kanalının pH'sı olmak üzere sıcaklık ve rutubeti etkilemektedir. Enzimler genellikle ince bağırsak pH'sı koşullarında (pH: 5.5-7.0) yüksek aktiviteye sahiptirler (Alp ve ark., 1999).

Her enzim farklı bir madde üzerine etkilidir. Bu nedenle yemlere enzim ilavesi yapılırken rasyon bileşimine göre seçim yapılmalıdır. Arpa ve çavdar ağırlıklı kanatlı yemlerinde glukanazların (Demirel ve Gürbüz, 1999) yüksek düzeyde ham selüloz içeren kalitesiz kaba yemlerde selülazların, yüksek oranda nişasta içeren kuzu-buzağı başlangıç yemlerinde amilazların kullanımı faydalıdır. Enzim kullanımı yem maddelerinin sindirimini artırırken metabolizable enerji (ME) değerlerini de artırmış olur (Coşkun ve ark., 2000).

Genç hayvanlarda enzim sistemi yaşla birlikte gelişmektedir. Bu nedenle genç hayvanlarda dışarıdan verilen lipaz, amilaz, proteaz gibi enzimler etkili

olmaktadır (Demirel ve Gürbüz, 1999). Enzimlerin etkisini belirleyen diğer bir faktör hayvanın türüdür. Enzimler kanatlılarda diğer türlere göre, daha etkin şekilde kullanılmaktadır. Kanatlılarda besinlerin sindirim sisteminden geçiş hızı yüksektir (Ergün, 2001). Ruminantlardaki gibi gelişmiş bir mikrobiyal sindirime ve bitki hücre duvarını parçalayacak enzimlere sahip değildir. Dolayısıyla besin maddelerinden yeterince faydalanamazlar (Sevgili ve Özen, 1999). Enzimler genel olarak yemlerin sindirilebilirliğini arttırmak suretiyle, yemden yararlanma yeteneğini yükseltmek amacıyla kullanılmaktadır.

Enzim ilavesi ile;

- Tahıl tanelerinin hücre duvarındaki sindirilemeyen polisakkaritlerin parçalanması sağlanır (Demirel ve Gürbüz, 1999).
- Bu polisakkaritlerin artırdığı bağırsak viskozitesi düşürülür, altlık kalitesinin olumsuz etkilenmesi önlenir (Coşkun ve ark., 2000).
- Yemlerin sindirilebilirliği ve metabolik enerji değerleri yükseltilir (Demirel ve Gürbüz, 1999).
- Yemden yararlanma yeteneği artırılır (Sevgili ve Özen, 1999).
- Fosforun yararlılığı artırılır (Ceylan ve ark., 1999).

1.2.1.1. Nişasta ve Amilazlar

Nişasta, hemen hemen bütün bitki hücrelerinde bulunmasına karşın, bitkisel tohumlar, yumru kökler nişastaca daha zengindir. Depo polisakkarit olan nişasta glukoz monomerlerinden oluşan bir homopolisakkarittir (Kalaycıoğlu ve ark., 2000).

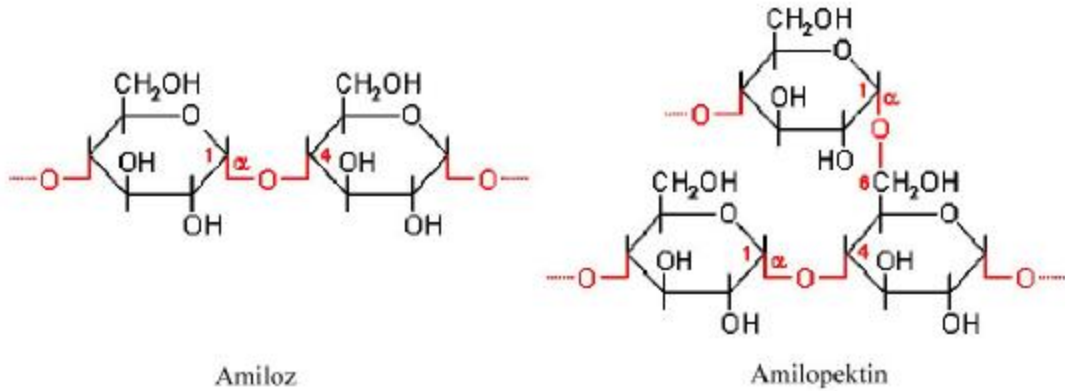
Nişasta soğuk suda çözünmeyen granüller formunda olup, organizmalar için depo materyali olarak bitki hücrelerinde depolanan önemli bir karbonhidrattır. Mısır, patates, pirinç ve buğday gibi birçok hububatın ana bileşenidir (Polaina ve MacCabe, 2007).

Nişasta suda çözünmeyen granüller halinde plastidlerde bulunur. Bu granüllerin büyüklüğü, şekli ve kompozisyonu bitkinin cinsine, bulunduğu organa veya bitkinin içinde bulunduğu büyüme evresine göre değişir. Örneğin buğdayda granül çapı 10 µm'den küçük olanlar ve 10-35 µm arasında olanlar olarak iki farklı

tip bulunurken, patatesten çapı 5-100 μm arasında değişebilen tek tip granül vardır. (Smith, 2001).

Amilazlar, endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Endoamilazlar nişasta molekülünün iç kısmını rastgele noktalardan parçalar ve değişik zincir uzunluğunda düz ve dallanmış oligosakkaritleri oluştururlar. Ekzoamilazlar ise, nişasta molekülünü indirgen olmayan ucundan parçalarlar. Günümüzde nişastayı değişik ürünlere parçalayan birçok enzim bilinmektedir (Gupta ve ark., 2003).

Nişasta ekstraksiyon ve fraksiyonlama ile iki farklı maddeye parçalanır: Amiloz ve amilopektin. Nişasta granülleri amiloz ve amilopektin olarak adlandırılan α -D-glukoz birimlerinden meydana gelmiş iki tip molekülden oluşmaktadır. Amiloz, glukoz birimleri arasında α -1,4- glikozidik bağ ile bağlanmasından oluşan ve dallanma göstermeyen düz bir yapıdadır. Amilopektin ise glukoz birimleri arasında α -1,4 bağlantısına ilaveten α -1,6-glikozidik dallanma bağ noktalarını da içermektedir (Şekil 1.4). Amiloz ve amilopektin içeriği bitki türlerine bağlıdır. Örneğin, buğday nişastası yaklaşık %25 amiloz içerirken, mısır nişastası %97-99 oranında amilopektine sahiptir (Polaina ve MacCabe, 2007).



Şekil 1.4. Amiloz ve amilopektin glukoz polimerleri

1.2.1.1(1). Nişastayı Parçalayan Enzimler

Amilazlar, nişasta molekülündeki dekstrin ve şekerlerin 1,4 glikozidik bağlarını parçalarlar. Endüstride kullanılan amilazlar bakteri ve mantar

kültürlerinden üretilmektedir. Amilazların α ve β olmak üzere iki farklı türevidir. α -Amilaz enzimi nişasta zincirlerindeki α -1,4 glikozidik bağları parçalarken, β -amilaz enzimi ise zincirin sonundaki indirgenmeyen maltozu parçalar. Bazı aminoglikozidazlar ise zincirin sonunda kalan glikoz artıklarını hidrolize ederler (John ve Sons, 1998). Amilazlar nişastayı parçalama mekanizmasına göre sınıflara ayrılırlar:

a) α -Amilazlar (E.C. 3.2.1.1): α -Amilazlar nişasta polisakkaritini rastgele parçalayarak, dekstrinler, oligosakkaritler ve monosakkaritler meydana getirir (Gupta ve ark., 2003). Nişasta molekülündeki amiloz zincirinin α -1,4 bağlarına rastgele etki ederek son ürün olarak 1/10'u glikoz ve 9/10'u maltoz olan bir karışımı meydana getirir. α -Amilazlar 1,6 glikozidik bağ ile karşılaştığında bu bağa etki etmeden geçer. Amilopektin hidrolizi sonucunda glikoz ve maltoza ek olarak bir dizi dallı sınır dekstrinler oluşmaktadır. Dört veya daha fazla glikoz içerikli bu dekstrinler orijinal yapının 1,6 glikoz bağlarını içermektedir. Belirli sayıda glikoz ünitesi kalınca dallanma noktasına amilazlar etki edemediğinden bu dekstrinlere sınır dekstrin (limit dekstrin) denilmektedir. Nişastanın enzimatik hidrolizi sonunda oluşan ürünler α -optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere α -amilazlar denilmektedir. Ayrıca bu enzimler nişastanın iç kısımlarındaki α -1,4 bağlarına etki yaptıkları için endoenzimlerdir (Aiyer, 2005).

b) β -Amilazlar (E.C. 3.2.1.2): Nişasta molekülünün indirgen olmayan ucunda ardı ardına gelen maltoz birimlerini uzaklaştıran enzimlerdir. Etkileri, β -1,6 bağlarına gelince durur. Böylece sınır dekstrinler meydana gelmektedir. Hidroliz sonucu açığa çıkan ürünler β -optik konformasyonu gösterdiğinden bu enzimlere de β -amilazlar adı verilmiştir. Genel olarak β -amilazlar nişastanın dış kısmındaki 1,4 bağlarına etki ettikleri için ekzoenzimlerdir. α -amilaz ve β -amilaz ile birlikte kullandığında nişasta maltoza indirgenir (Aiyer, 2005).

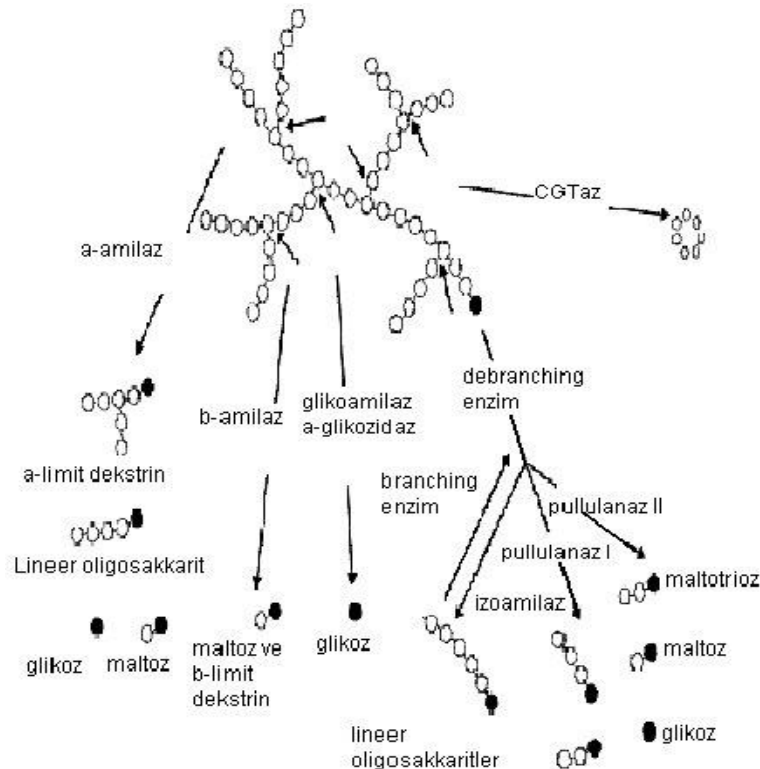
c) Amiloglikozidazlar (Glikoamilazlar) (E.C. 3.2.1.3): Glukoamilaz olarak da adlandırılan bu enzim genel olarak funguslar tarafından oluşturulmaktadır. Nişasta zincirinin ucundaki indirgen olmayan kısımdan, ardışık olarak glikoz birimlerini uzaklaştıran bir ekzoenzimdir. Amiloglikozidazların ürün olarak sadece glikoz

oluşturması bu enzimleri, α - ve β - amilazdan ayırmaktadır. Hem α -1,4 bağlarını etkiler hem de yavaş bir hızla da olsa α -1,6 bağlarını hidroliz eder.

d) Pullulanazlar (E.C. 3.2.1.41): Substrat molekülünün sadece α -1,6 bağları üzerinde spesifik aktivite gösterdikleri için ‘sınır dekstranazlar’ olarak da adlandırılırlar (Aiyer, 2005). Pullulanazlar, glukoz ve maltoz verimini artırır.

e) α -Glukozidazlar (E.C. 3.2.1.20): Amiloz ve amilopektinin parçalanma ürünleri olan kısa zincirli oligosakkaritlerdeki α -1,4 bağlarını hidroliz ederek serbest glukoz birimleri oluşturan enzimlerdir (Aiyer, 2005).

f) CGTazlar (Siklodekstrin glukano transferaz) (E.C. 2.4.1.19): Nişastayı, siklodekstrin adı verilen ve 6,7 veya 8 glukoz ünitesinden oluşan siklik D-glukozil birimleri oluşturan enzimlerdir. *Bacillus macerans* amilazları bunlara örnektir (Aiyer, 2005). Amilolitik enzimler ile bu enzimlerin nişastayı hidrolizi sonucu açığa çıkan ürünler Şekil 1.5.’de verilmiştir.



Şekil 1.5. Amilolitik enzimlerin nişastayı hidrolizi ve açığa çıkardıkları ürünler (Bertoldo ve Antranikian, 2002)

1.2.1.1(2). 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 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 (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).

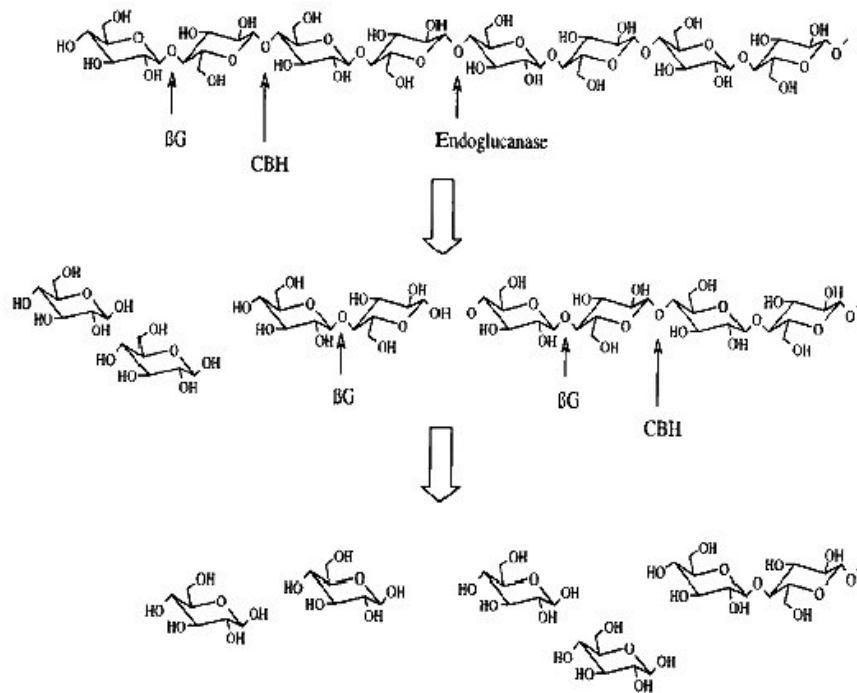
1.2.1.2. Selüloz ve Selülaz (Glukanaz) Enzimleri

Dünya üzerinde en çok bulunan doğal organik kaynak olan selüloz, bitkisel kaynaklı olup basit bir disakkarit olan sellobiyoz tekrarlanan ünitelerinden oluşmaktadır. Selüloz fibriler yapıda, sert bir madde olup, bitkilerin hücre duvarında

yer almakta ve bitki biyokütlesinin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır (Niehaus ve ark., 1999).

Selüloz, nişastadan farklı olarak düz bir zincir şeklinde olup herhangi bir sarmal yapı göstermez. Selüloz zincirleri hidrojen bağları ile bağlanarak bir arada tutulurlar. Bazı durumlarda selüloz neredeyse saf olarak bulunur. Birçok durumda ise selüloz lifleri hemiselüloz ve lignin gibi diğer yapısal biyopolimerler arasına katılabilmektedir. Selülozun önemli bir özelliği, diğer polisakkaritlerden farklı olarak kristal yapı oluşturabilmeleridir (Bhat, 2000).

Yaklaşık 15,000 glikoz biriminin β -1,4-glikozidik bağlar ile linear bir şekilde bağlanması ile oluşan selülozun suya karşı afinitesi yüksek olmasına rağmen, suda hiç çözünmemektedir. Selülozu hidrolize eden selülaz enzimleri büyük ölçüde fungus ve bakterilerden elde edilmekte ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır (Niehaus ve ark., 1999). Selülozu parçalayan selülaz enzimleri ekzoglukanazlar (sellobiyohidrolazlar, CBH, (E.C. 3.2.1.91)), endoglukanazlar (endo- β -1,4 glukanaz, CMCase, (E.C. 3.2.1.4)) ve β -glukozidazlar (E.C. 3.2.1.21) olmak üzere üç gruba ayrılırlar (Lynd ve ark., 2002).



Şekil 1.6. Selülazların selülozu hidroliz mekanizması (Nousiainen ve Buchert, 2004)

a) Ekzoglukanazlar (Sellobiyohidrolazlar (CelloBioHydrolase CBH):

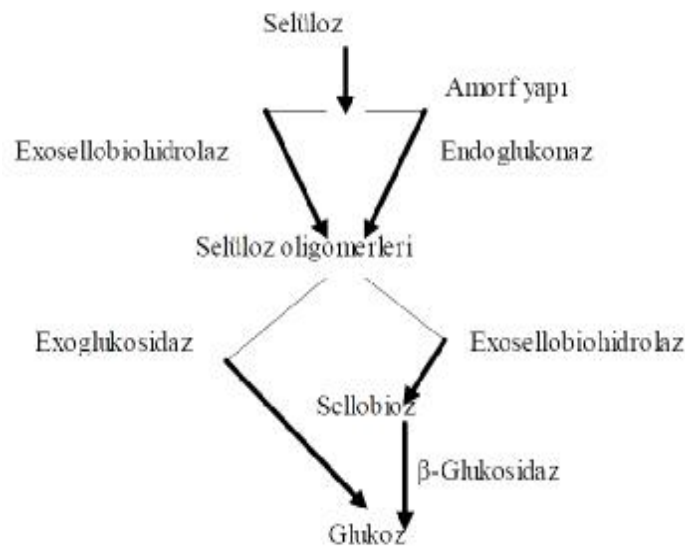
Selüloz polimerinin bütünü halinde veya endoglukanazlar tarafından parçalanmış bölgelerdeki ara ürünlerin uçlarından parçalamaya başlarlar (Şekil 1.6). Son ürünleri sellobiyozdur. Bu grup enzimlerin iç kısımlarında tüneli andıran bir boşluk bulunmaktadır ve selüloz polimerinin ucunu bu boşluk içine alarak aktivite gösterirler.

b) Endoglukanazlar (endo- β -1,4 glukonaz, CMCaz) (E.C. 3.2.1.4):

Selüloz polimerinin orta kısmından (genelde amorf bölgeden) saldırır ve parçalarlar. Son ürünleri sellobiyozdur. Bu grup enzimlerin oyukları vasıtasıyla polimeri kavradıkları ve parçaladıkları bildirilmektedir. Bazı endoglukanazlar ise selüloz bağlayıcı modüller (CBM, Cellulose Binding Modül) vasıtasıyla selüloz polimerine bağlandıktan sonra polimeri parçalama işlemini gerçekleştirirler. Bu grubun aktivitesi daha yüksektir.

c) Betaglukozidazlar (BGL) (E.C. 3.2.1.21):

Ara ürün olan sellobiyozları glukozla parçalarlar. *Aspergillus* türlerinin β -glukozidazları, ortamda oluşan glukozla inhibe olmazken *Trichoderma reesei* β -glukozidazları ortamda oluşan glukoz ile inhibe olurlar (Lynd ve ark., 2002). Selülozun selülaz enzimlerince glukozla kadar parçalanmasının şematik modeli Şekil 1.7’de verilmiştir.



Şekil 1.7. Selülozun selülazlar yardımıyla glukozla kadar parçalanması (Duran ve Korkmaz, 1999)

1.2.1.2(1). Yem Katkı Maddesi Olarak Selüloz Enziminin Kullanımı

Hayvan yemlerine enzim katılması ile ilgili ilk uygulama 1980 yılında Finlandiya’da yapılmıştır. β -Glukanaz enziminin arpadan üretilen tavuk yemlerine karıştırılması ile birlikte, özellikle tavukçuluk sektöründe enzim kullanımı önemli boyutlara ulaşmıştır. Bu uygulamayı domuz yemleri izlemiştir. Ruminantlar uygulamanın nispeten daha az gerçekleştirildiği sektör olmuştur. Hayvan yemi üretiminin boyutları düşünüldüğü zaman enzimler için çok büyük bir potansiyel ortaya çıkmaktadır. Tek mideli hayvanların besinlerinde şuan yaklaşık %10’luk bir uygulama söz konusudur (Wolfgang, 2004).

Özellikle hayvan yemi üretiminde tavukçuluk sektörünün hızlı gelişimine paralel olarak yem gereksinimi önemli boyutlara ulaşmıştır. Tavuk yemi üretiminde ana hammadde olarak mısırdan yararlanılmakla birlikte buğday, arpa ve çavdar da kullanılmaktadır.

Mısır yerine alternatif yem hammadde olarak arpa ön plana çıkmaktadır. Tavuklarda arpada bulunan β -glukanı [$\beta(1,3)(1,4)$ glukan] parçalayacak enzim sistemi yeterince gelişmediği için yem üretiminde enzim kullanımı zorunluluğu ortaya çıkmıştır. Özellikle glukanaz ve ksilanaz enzimi bu konuda ön plana çıkmaktadır (Wolfgang, 2004).

β -Glukan β -1,3 ve β -1,4 şeklinde bağlanmış lineer glikoz birimlerinden oluşur. Likenaz enzimi bu bağların hem β -1,3 hemde β -1,4 bağlarını kopartarak etki gösterir. Bakteriler arasında *Cellulomonas* sp., *Bacillus* sp. ve *Thermoactinomyces* sp. ekstraselüler selüloolitik aktiviteye sahip organizmaları oluşturur. Mantarlar arasında *Trichoderma reesei* en önemli selüloz üreticisidir. Arpanın yaklaşık %3-4’ü β -(1,3)(1,4) glukandan oluşmaktadır. β -(1,3)(1,4) glukan tavuk ve domuzlar tarafından sindirilemediği için sindirim sisteminde viskos bir yapı oluşmakta ve dışkının yoğunluğu artmaktadır (Wolfgang, 2004). Ruminant ve monogastrik hayvanlar yemlerinde sindirilebilirliği artırmak amacı ile, lignoselülozik materyallerin ön işlemden geçirilmesinde, hububatların kabuklarından arındırılmasında, ruminant ve monogastrik hayvanların selülozda yararlanmalarını artırmak için silaj yapımında [$\beta(1,4)$ glukanaz] kullanılırlar.

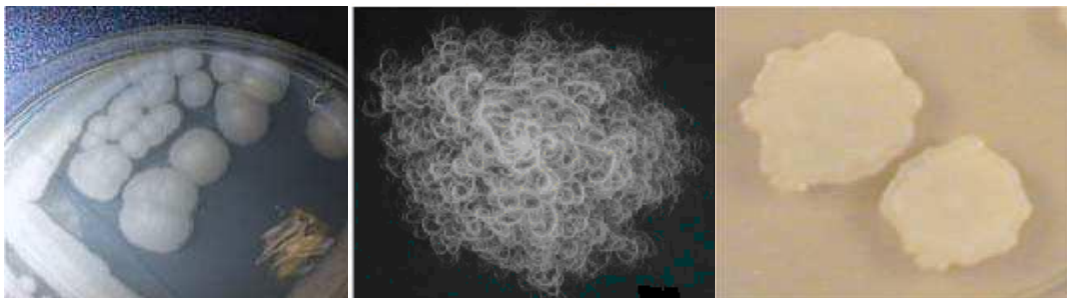
1.3. *Bacillus* Türlerinin Genel Özellikleri

Bacillus hücreleri çomak şekilli, düz veya hemen hemen düze yakın, çoğu olumsuz ortam koşulları için çok dirençli, endospora sahip, açık havada spor oluşturması engellenmeyen, gram pozitif, peritrik kamçılı, aerobik veya fakültatif anaerob bir bakteridir. Birçok türünde hücre duvarı çapraz bağlarla bağlı mezodiamino pimelik asitten oluşur (Özçelik, 1995). Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrofilik ve termofilik türleri de vardır (Ayhan, 2000).

Vejetatif hücreler, tek başına veya zincir şeklinde bulunabilir. Yuvarlak veya köşeli şekilde biten hücrelerin büyüklükleri $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$ 'den $2,5 \times 10 \mu\text{m}$ 'ye değişmektedir. Hücreler, Gram-pozitif boyanır, ancak bazıları kültürün yaşına bağlı olarak Gram- negatif reaksiyon verebilirler (Rosovitz ve ark, 1998).

Optimum büyüme sıcaklıkları 25°C ile 37°C 'de arasında değişmektedir. Ancak termofilik ve psikofilik türleri 75°C 'den daha yüksek ve 3°C 'den daha düşük sıcaklık derecelerinde büyüebilme yeteneğine sahiptirler. Bazı türleri 2 ile 10 arasında değişen alkali ve asidik ortamlarda gelişebilirler (Sneath, 1986).

Bacillus türlerinin koloni özellikleri çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Besiyeri çeşidi, koloninin yaşı gibi özelliklere göre, yarı şeffaf, opak, düzgün ya da pürüzlü koloniler görülebilir. Koloni renkleri kreme yakın beyazdan sarıya doğru olabilir (Şekil 1.8). Çoğu *Bacillus* türü pigment oluşturmaz, ancak bazı türler farklı besi yerlerinde sarı, yeşil, mavi-siyah v.b pigmentler üretebilirler (Rosovitz ve ark, 1998; Sneath, 1986).



B. megaterium

B. mycoides

B. subtilis

Şekil 1.8. Bazı *Bacillus* türlerine ait koloni şekilleri (Rosovitz ve ark, 1998)

1.3.2. *Bacillus* Türlerinin Genetik Yapısı

Bacillus genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılan *B. subtilis* türü oldukça iyi tanımlanmış olup, genom büyüklüğünün 4,2 Mbp olduğu ve 4100 protein kodlayan gen içerdiği bildirilmiştir (Wipat ve Harwood, 1999).

Genel ve özel transdüksiyon, plazmid DNA aktarımı, plazmid ve bakteriyofaj vektörleri ile ilgili moleküler genetik araştırmalarda *B. subtilis* türünün yanı sıra *B. brevis*, *B. cereus* ve *B. coagulans* gibi türler de kullanılmaktadır (Sneath, 1986).

1.4. Araştırmanın Amacı ve Kapsamı

Bu çalışmanın amacı farklı bölgelerde bulunan tuzlu ve bazik ortamlardan (tuz ve sodalı göllerden) bakteri izolasyonunu gerçekleştirmek ve bu bakterilerce üretilen endüstriyel öneme sahip enzimlerin (α -Amilaz, ksilanaz, likenaz, selüloz, proteaz, inülinaz), tanımlanmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirerek hayvan besleme alanında yem katkı maddesi olarak kullanma olanaklarını araştırmaktır.

Araştırmanın kapsamı aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

1. Farklı bölgelerden (Urmu Gölü-İran, Tuz Gölü ve Van Gölü-Türkiye, Hazar Denizi-İran) su ve toprak numunelerinin alınması.
2. Elde edilen numuneler 80 °C’de 10 dk inkübe edilerek vejetatif hücrelerin öldürülmesi (pastörizasyon).
3. Numuneler LB zengin besiyerine aktararak bakteri sporlarının aerobik ortamda çimlenmesinin sağlanması.
4. Zengin sıvı besi yerlerinde çimlenen bakteriler katı besiyerlerine alınarak koloni oluşturmalarının sağlanması.
5. Tek tek seçilen kolonilerin nişasta, CMC, ksilan, likenan, inülin, gibi substratlar içeren katı besiyerlerine ekilerek ilgili enzim aktivitelerinin tespit edilmesi.

6. Bakterilere ait adı geçen enzimlerin DNS yöntemi ile fiziksel özellikleri (optimum pH, optimum sıcaklık, sıcaklık direnci, zamana göre enzim aktivitesi vb.) belirlenmesi.
7. SDS-PAGE ve zymogram analizleri ile enzimlerin bant profillerinin karşılaştırılması ve moleküler ağırlıklarının ve enzim üretme kapasitelerinin (spesifik aktivite) belirlenmesi.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Amilazla İlgili Yapılmış Önceki Çalışmalar

Campbell (1952), 35°C’de ve 55°C’deki üreyen hem *Bacillus stearothermophilus* hemde *Bacillus coagulans*’dan elde edilen amilazların karşılaştırmasını yapmıştır. 55°C’de üretilen amilazların 35 °C’de üretilenlerden bir şekilde daha yüksek optimum aktiviteye sahip olduklarını ortaya koymuştur. 35°C’de elde edilen amilazların 90°C’ye maruz bırakıldıklarında 2 saat sonra aktivitelerini kaybettikleri fakat 55 °C’de elde edilen amilazların ise 24 saat sonunda aktivitelerini %50 oranında koruduklarını belirtmiştir.

Morgan ve Priest (1981), izolasyonunu yaptıkları *Bacillus licheniformis* NCIB 6346 suşundan saflaştırdıkları α -amilaz enziminin optimum sıcaklığını 70-90 °C arasında olduğunu bulmuşlardır. Enzimin optimum pH 7.0’de aktif olduğunu gözlemlerlerken pH 7.0-10.0 arasında stabil olduğunu görmüşlerdir. Enzimin moleküler ağırlığını ise 62.65 kDa olarak belirlemişlerdir.

Zhang ve ark. (1983), besin ortamında glisin bulunduğu zaman *Bacillus amyloliquefaciens* suşunda α -amilaz üretiminde artış gerçekleştiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar glisin etkisinin ise murein tabakasının sentezinde rekabetçi inhibisyona neden olduğunu ve amilaz üretimini arttırdığını belirtmişlerdir.

Bajpai ve Bajpai (1987), *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13 suşundan elde edilen enzimin yüksek sıcaklıkta ve geniş pH aralığında nişastanın sıvılaştırılmasında kullanışlı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, termostabil α -amilazın son birkaç yılda çok fazla kullanım alanına sahip olduğunu, kağıt ve tekstil endüstrisinde, nişastanın sıvılaştırılmasında, yiyecek endüstrisinde, tutkal sanayisinde ve şeker üretiminde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Vihinen ve Mantsala (1990), *Bacillus stearothermophilus*’dan elde edilen α -amilazın aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın 50-70°C olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada *Bacillus stearothermophilus*’da α -amilaz aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklığın 70-80°C olduğunu bulmuşlardır.

Kim ve ark (1995), alkalifilik *Bacillus sp.* izolatından pH 11.0 ve 12.0 da en iyi aktivite gösteren maltotrioz üreten alkali α -amilaz üretimini gerçekleştirmiştir.

Sidhu ve ark (1997), termostabil amilaz üretimi amacı ile suş geliştirme deneyleri yapmışlar ve etilmetan sülfonat ile mutasyon çalışmaları sonucunda, enzim üretiminde 40 kat daha yüksek miktarda ürün almayı başarmışlardır.

Lin ve ark (1998), *Bacillus sp.* TS-23 suşunda SDS-PAGE ile, amilolitik aktivite gösteren moleküler ağırlıkları 150-45 kDa olan iki amilaz bandı bulmuşlardır. Araştırmacılar enzim sentezinin 42-60°C sıcaklıkta, optimum 55°C de meydana geldiğini *Bacillus sp.*TS-23 suşunun 55°C de ürediğini bulmuşlardır. Bu sonuçlarda amilaz üretimi ve bakteri üremesi için optimum sıcaklığın aynı olduğunu göstermişlerdir.

Mamo ve ark (1999), Etiyopya'da sıcak su kaynaklarından izolasyonunu yaptıkları termofilik *Bacillus sp.*'den izole edilen amilaz enziminin optimum 75-80°C'de ve pH 5.0 –8.0 arasında çalıştığını saptamışlar ve 105°C'de termal stabilite üzerine Ca^{+2} etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Duedahl-Olesen ve ark (2000), *Bacillus clausii*'den optimum pH 9.5 ve 55°C de aktivite gösteren, moleküler ağırlığı 101 kDa olan, nişastadan maltoheksoz oluşturabilen amilaz izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Hagihara ve ark (2001), Optimum pH 8.0-9.5 ve 55-60°C'de aktivite gösteren, şelatörlere ve kimyasal oksidantlara karşı oldukça dirençli olduğunu bildirdikleri α -amilazın molekül ağırlığını 55 kDa olarak bulmuşlardır.

Deutch (2002), tuza karşı toleransı bulunan *Bacillus dipsosauri*'den ürettikleri amilazın optimum pH 6.5 ve 60°C aktivite gösterdiğini ve 1.0 mol L-1 KCl de büyük bir aktivite toleransına sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Amoozegar ve ark (2003), % 15 (w/v) Na_2SO_4 gibi stres altında üretilen ekstrasellüler amilazın enziminin optimum aktivite sıcaklığının 50°C ve optimum pH aktivitesinin ise pH 7.5-9.0 arasında olduğunu rapor etmişlerdir.

Das ve ark (2004), *Bacillus subtilis* suşundan, moleküler ağırlığı 42.8 kDa optimum aktivite sıcaklığı 52-55°C ve pH 9.0 olan, alkali α -amilaz izolasyonu yapmışlardır.

Konsula ve Kyriakidis, (2004), mezofilik *Bacillus subtilis* suşundan izolasyonunu yaptıkları ekstrasellüler termostabil alfa-amilaz enziminde en yüksek aktivitenin 135°C ve pH 6.5’da gerçekleştiğini bulmuşlardır. Artan termostabilitenin varlığı bu enzim için de rapor edilmiştir.

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

Hutcheon ve ark (2005), halofilik arkeon *Haloarcula hispanica*’dan elde edilen alfa-amilazın %23 tuz konsantrasyonlarında stabil olduklarını hatta üre varlığında dahi stabilitesinin devam ettiğini bulmuşlardır. Normalde tuz bulunmayan ortamlarda ürenin enzim inhibisyonunu gerçekleştirdiği belirtilmiştir.

Saxena ve ark (2007), izole ettikleri amilaz enziminin, maksimum aktivitesini pH 10.0 ve 90°C’ gerçekleştirdiği ve enzimin 80-100°C arasında %100 stabil davranış gösterdiğini saptamışlardır.

Asgher ve ark (2007), *Bacillus subtilis*’den izolasyonunu yaptıkları termostabil alfa-amilazın optimum aktivitesinin pH 8.0 ve 70°C olduğunu bulmuşlar ve 60°C’de 1 saat süreyle stabilitesini koruduğunu saptamışlardır.

Aygan (2008), optimum sıcaklığı 150 °C ve optimum pH’sı 10.5 olan *Bacillus* sp. AB-17 suşuna ait amilaz izolasyonunu gerçekleştirmiştir.

2.2. Selülozla İlgili Yapılmış Önceki Çalışmalar

Robson ve Chambliss (1984), *Bacillus* sp.'den üretilen selüloz enziminde aktivite analizi yapmışlar ve maksimum selüloz aktivitesin pH 4.8 ve 58°C'de gerçekleştiğini bulmuşlardır.

Hreggvidsson ve ark. (1996), izole ettikleri termofilik selüloz enziminn moleküler ağırlığının 49 kDa, optimum aktivite pH'ının 7.0 olduğunu saptamışlardır. Enzim 100°C de 3.5 saat inkübe edildiğinde orijinal aktivitesini %50 korurken, 90°C de 16 saat inkübe edildiğinde %80 koruduğunu göstermişlerdir. Enzim yüksek düzeyde termostabil olarak tanımlanmıştır.

Hakamada ve ark. (1997), alkalifilik *Bacillus* sp. KSM-S237'den izole edilmiş termostabil alkali selülazın optimum aktivitesini pH 8.6-9.0 ve 45°C'de gösterdiği bildirmişlerdir.

Yernool ve Eveleigh (1998), iki termostabil endoselüloz izolasyonu yapmış ve moleküler ağırlıkları 29 ve 30kDa olan enzimlerin optimum pH 6.0-6.6 ve 95°C'de aktif olduklarını bulmuştur.

Bok ve ark. (1998), *Thermotoga neapolitana* bakterisinden moleküler ağırlıkları 29 ve 30 kDa olan iki termostabil endoselüloz izolasyonu yapmış ve enzimlerin optimum pH 6.0-6.6 ve 95 °C'de aktif olduklarını bulmuşlardır.

Mawadza ve ark. (2000), iki *Bacillus* suşundan üretilen selülazın karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Her iki enzimin molekül ağırlığı 40 kDa olup, enzimlerin otimum aktivitelerini pH 5.0-6.5'de ve 65 ve 70°C'de gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Singh ve ark. (2001), termostabil alkali CMC-az enzimini *Bacillus* sp. VG1 suşundan izole etmişler ve enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 9.0-10.0, yarılanma ömrünün ise 100°C'de 12 dakika olduğunu bulmuşlardır.

Endo ve ark. (2001), *Bacillus* sp. KSM-N252 suşundan izole edilen endoglukanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH'nın 10.0 ve sıcaklığın 55 °C olduğunu saptayarak, enzimin moleküler ağırlığının 50 kDa olduğunu belirlemişlerdir.

Coral ve ark. (2002), *Aspergillus niger*'den moleküler ağırlıkları 83 ve 50 kDa olan, optimum aktivitesini pH 3.0-9.0 aralığında gösteren CMCaz enzimi izole etmişlerdir. Enzimin optimum aktivite sıcaklığını 40°C bulmuşlardır.

Hakamada ve ark. (2002), alkalik endoglukanaz enzimini *Bacillus circulans*'dan izole ederek pH 8.5'da ve optimum sıcaklığının 55 °C olduğunu ve moleküler ağırlığının 43 kDa olduğunu saptamışlardır.

Huang ve Monk (2004), *Caldibacillus cellulovorans*'dan izolasyonunu yaptıkları CMCaz enziminin 85.1 kDa molekül ağırlığına sahip olduğunu ve maksimum aktivitenin ise 80°C'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Singh ve ark. (2004), *Bacillus sphaericus* JS1 suşundan alkali selüloz enzimi izole ederek enzimin üretimi ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlığının 42 kDa olduğu saptanmış ve enzimin termostabilite, pH stabilitesi ve hidrolitik kapasitesi açısından, deterjan sanayi için uygun olduğunu belirtmişlerdir.

Akita ve ark. (2005), *Bacillus halodurans* C-125 suşundan izole edilen enzimin ince tabaka kromatografisi analizinde endo özellik gösterdiğini bulmuşlardır. Enzim optimum aktivitesini 60°C de pH 6 ve 8 de göstermiştir. Enzimin orijinal aktivitesini 50 ve 60°C de 2 saatlik inkübasyondan sonra %100 koruduğunu saptamışlardır.

Grigorevski De Lima ve ark., (2005) *Streptomyces drozdowiczii* tarafından üretilen selüloz enziminin aktivitesini bulmak için , mikroorganizma 30°C'de temel karbon kaynakları ve temel nitrojen kaynaklarının bulunduğu kültürde üretilmiş süpernatant da maksimum CMSaz aktivitesinin 50°C'de pH 5 de olduğu gösterilmiştir.

Kim ve ark. (2005), alkalifilik *Bacillus* sp. suşundan HSH-810'dan alkali selüloz izolasyonu yapmışlar ve enzimin pH 10.0'da ve 50°C'de optimum aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Zverava ve ark. (2006), haloalkalifilik anaerobik bakteriden izole ettikleri selüloz enziminin moleküler ağırlığının 75 ve 84 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Hirasawa ve ark. (2006), alkalifilik *Bacillus agaradhaerens* suşundan izole edilen endoglukanaz enziminin moleküler ağırlığının 38 kDa, optimum aktivite

gösterdiği pH aralığının 7.0-9.4 ve optimum aktivite sıcaklığının 60°C olduğunu bulmuşlardır.

Kang ve ark. (2007), *Pyrococcus horikoshii*'den, kristalin selüloza karşı aktivitesi yüksek hipertermofilik selülaz (CMCaz) izolasyonu gerçekleştirmişler ve enzimin disülfid bağına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin optimum pH 5.5-6.0 arasında ve 90°C de aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Oyekola ve ark. (2007), izole ettikleri endoglukanaz enziminin pH optimumunun 6-6.5, sıcaklık optimumunun ise 50°C olduğunu saptamışlardır.

Aygan (2008), *Bacillus* sp. C-14 suşundan izole edilen endoglukanaz enzimin molekül ağırlığını 61 kDa olarak belirlemiş, optimum aktivitesini ise 50 °C'de ve pH 11.0'de gözlemiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3. 1. Materyal

3.1.1. Bakteri ve Besiyerleri

Bu çalışmada kullanılan halofilik, termofilik ve alkalifilik *Bacillus* sp suşları Hazar Denizi ve Van Gölü su ve toprak örneklerinden izole edilmiştir. Bakteriler 55°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 üretilmiştir. Çalışmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı EK-1'de verilmiştir.

3.1.2. 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, Spektrofotometreler Pharmacia (Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 4FJ, İngiltere)'dan, hassas terazi Ohaus (29 Hanover Road, Florham Park, NJ 07932, ABD)'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 Biohit ve Socharex'den, deepfreez ve no-frost buzdolabı Arçelik'den temin edilmiş olup tamamı Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuarları'nda mevcut bulunmaktadır.

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları EK-2’de verilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Katı Besiyerlerinde Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.1.1. Toprakta Alkalifilik, Halofilik ve Termofilik *Bacillus* sp. İzolasyonu

Bacillus sp. izolasyonu amacıyla Van ve Orumiyeh Gölleri ile Hazar Denizin’in farklı bölgelerinden toprak örnekleri alınmıştır ve bu örneklerden 1’er gr tartılıp 5 ml steril distile su ile karıştırıldıktan sonra süspansiyon haline getirilmiştir. *Bacillus* sp. sporlu bir bakteri olduğundan, elde edilen süspansiyon 80°C’de 10 dakika inkübe edilerek pastörizasyon uygulanmıştır (Lennete ve ark., 1985). Sıcaklık uygulamasından sonra pH’sı 9 ve %5 NaCl olan LB sıvı besiyerine bu süspansiyondan bir miktar ekilerek 1 gece 55 °C’de inkübe edilmiştir (Şekil. 3.1).



Şekil 3.1. LB (Luria-Bertani) besiyerlerinde bakterilerin aerobik koşullarda üretilmesi

Ertesi gün tek koloni oluşumunu sağlayabilmek için üreme gözlenen bakteriler kültüründen seri sulandırmalar yapılarak, pH'sı 9 ve %5 NaCl olan LB agar besiyerine yayma şeklinde ekim yapılmış ve 55 °C'ye ayarlanmış etüve konularak tekrar 1 gece süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyerinde tek düşmüş farklı morfolojik görünüme sahip 50 koloni seçilmiş ve numaralandırılmıştır. Ardından pH'sı 9 olan LB agar besiyerine steril kürdan ile ekim yapılarak enzim aktivitesinin saptanması amacı ile stok kültür şeklinde saklanmışlardır.

3.2.1.2. Katı Besiyerinde Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Tanımlanmaları yapılan stok *Bacillus* sp. suşları nişasta içeren (pH:9, %5 NaCl) LB agar besiyerine çizgi ekim tekniği kullanılarak aşılantmışlar ve 55°C'de 24 saat üremeye bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda koloniler üreme gözlendikten sonra iyodin buharı ile boyanarak amilaz aktivite zonları tespit edilmiştir (Hols ve ark., 1994; Arikan ve ark., 2003).

3.2.1.3. Katı Besiyerinde CMCaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Stok *Bacillus* sp. suşları %0.1 w/v CMC (karboksimetilselüloz) içeren pH'sı 9 , %5 w/v NaCl ayarlanmış LB agar besiyerine çizgi ekim tekniği kullanılarak aşılantmışlar ve 55°C'de 24 saat üremeye bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda koloniler %0.1'lik kongo kırmızısı ile 15 dakika boyandıktan sonra 1M'lık NaCl ile 15 dakika boyanın geri alınması işlemi uygulanmıştır. Kolonilerin etrafında kırmızı zeminde sarı zon oluşumu CMCaz enzim aktivitesince pozitif olduğu şeklinde değerlendirilmiştir (Hols ve ark., 1994; Arikan ve ark., 2003).

3.2.2. Enzimlerin Üretimi ve Kantitatif Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

%0.5 w/v nişasta içeren LB/Nişasta/Agar (pH: 9) besiyerine ekilerek amilaz aktivitesine sahip olduğu belirlenen ve *Bacillus* sp. olan izolat LB (pH: 9) sıvı

besiyerinde 55 °C’de 1 gece (250 devir/dakika) çalkalayıcıda üretilmiştir. Daha sonra bakteri kültürü 4950 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek çöktürülmüş ve hücresiz süpernatant elde edilmiştir. Enzimi de içeren bu süpernatant amilaz enzimi analiz çalışmalarında kullanılmıştır.

%0.1 w/v CMC içeren LB/CMC/Agar (pH: 9) besiyerine ekilerek CMCase aktivitesine sahip olduğu belirlenen ve *Bacillus* sp. olan izolat LB (pH: 9) sıvı besiyerinde 55 °C’de 1 gece (250 devir/dakika) çalkalayıcıda üretilmiştir. Daha sonra bakteri kültürü 4950 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek çöktürülmüş ve hücresiz süpernatant elde edilmiştir. Enzimi de içeren bu süpernatant CMCase enzimi analiz çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.2.1. Enzimlerin Zamana Göre Optimum Aktiviteleri

Zamana göre enzimleri optimum aktivite gösterdiği değerinin belirlenmesi amacı ile enzim aktivite sahip olduğu belirlenen ve *Bacillus* sp. olan izolatlar için LB (pH: 9) sıvı besiyerinde 55 °C’de inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Her 12 saatte (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 CMC) 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 rölatif aktivite saptanmıştır.

3.2.2.2. 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 inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Analizler 30-100°C aralığında su banyosunda 30 dakika süresince gerçekleştirilmiştir.

Enzim (1 ml) ve substrat (1 ml %2'lik nişasta, ksilan ve CMC) karışımı (bakteri üremesinin gerçekleştiği optimum pH değerinde veya yakın hazırlanmış) yukarıda belirtilen sıcaklıklarda 30 dakika inkübe edildikten sonra örnek karışımına eşit hacimde DNS eklenerek 5 dakika kaynatma işlemi uygulanmıştır. Soğutulan örnekler 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede değerlendirilmiştir. En yüksek absorbansın elde edildiği sıcaklık değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif aktivite saptanmıştır.

3.2.2.3. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Belirlenmesi

Santrifüj ile *Bacillus* sp.'ler çöktürülerek elde edilen enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri pH değerlerinin saptanması için Na-fosfat (pH 5.5-8) ve tris (pH 7.5-12.0) tamponları kullanılarak farklı pH değerlerine sahip (pH 6.0-12.0) ve içerisinde % 2 Nişasta veya CMC 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 ayırıcı 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 bulunmuştur.

3.2.2.4. İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarının Farklı Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması

İzolasyonları yapılan alkalifilik, termofilik ve halofilik *Bacillus* sp. suşlarının substrat spesifisitelerini belirlemek amacıyla ilgili substratlar enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık ve pH değerlerinde 30 dakika boyunca su banyosunda reaksiyona tabi tutulmuşlardır. Enzim (1 ml) ve substrat (1 ml %2'lik nişasta ve CMC) karışımı optimum aktivite sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra örnek karışımına eşit hacimde DNS eklenerek 5 dakika kaynatma işlemi

uygulanmıştır. Soğutulan örnekler 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede değerlendirilmiştir. Enzimsubstrat karışımından elde edilen spektrofotometrik değerden substrata ait spektrofotometrik değer çıkarılarak enzimin substrat spesifisite değeri elde edilmiştir.

3.2.2.5. İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarının Spesifik Aktiviteleri

Spesifik aktivite Lowry ve ark (1951) yöntemine göre yapılmıştır. Alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{+2}) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve Cu^{+1} e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr, Trp ve Cys aminoasitleri Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 660 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Lowry yöntemiyle, örnek ve standart tüplerine 1 mL protein çözeltisi ve standart çözeltiler, kör tüpüne de 1mL saf su koyulur. Sonra tüm tüplere 3 mL C reaktifi eklenir. (C reaktifi 100:1 oranında A ve B reaktifi karışımından oluşturulur. A reaktifi %2 Na_2CO_3 , % NaOH, % 0.16 Na-tartarat; B reaktifi ise %4 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ’dır). Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir. Tüm tüplere 300 μL Folin-Fenol reaktifi vortekslenerek eklenir ve sonra oda sıcaklığında 45 dakika bekletilir. Absorbanslar 660 nm’de köre karşı okunur. Protein miktarları oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanarak hesaplanır.

3.2.3. Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ve Zymogram Analizi

Enzimlerin moleküler ağırlıkları ve enzim fraksiyonuna ait aktivitenin (zimogram) analizi için SDS-PAGE jel sistemlerinden yararlanılmıştır (Laemmli, 1970).

3.2.3.1. Hücre dışı Proteinlerin TCA Muamelesi İle Elde Edilmesi

Bakterilerden hücre dışı proteinler Ek 1.8.'de verilen protokole göre TCA muamelesi ile elde edilmiştir. Protein örnekleri üzerine hacmin yarısı kadar kaynatma solüsyonu (Ek. 2.20.) ilave edilerek SDS-PAGE'de elektroforez için hazır hale getirilmiştir.

3.2.3.2. SDS-PAGE Sisteminin Hazırlanması (Laemmli, 1970)

%12'lik toplayıcı jel aşağıda verilen oranlarda kimyasalların ilavesiyle hazırlanır: 12 ml akrilamid (% 30 w/v; 30 gr akrilamid ve 0.8 gr bisakrilamid tartılarak toplam 100 ml olacak şekilde saf suda çözülür.)

5.62 ml Tris (2 M, pH 8.8)

0.3 ml SDS (%10 w/v)

12.1 ml saf su

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 dökülür. Üzerine ince bir katman oluşturacak şekilde su ile satüre edilmiş bütanol ilave edilerek donması için 45 dk beklenir. Jel donduktan sonra üstteki bütanol bir teksir kağıdına emdirilerek alınır. Bu arada aşağıda verilen oranlarda kimyasalların karışımıyla toplayıcı jel bir erlen içerisine hazırlanır:

1.8 ml Akrilamid

3.65 ml Tris (0.5 M, pH 6.8)

0.15 ml SDS (%10)

9.4 ml saf su

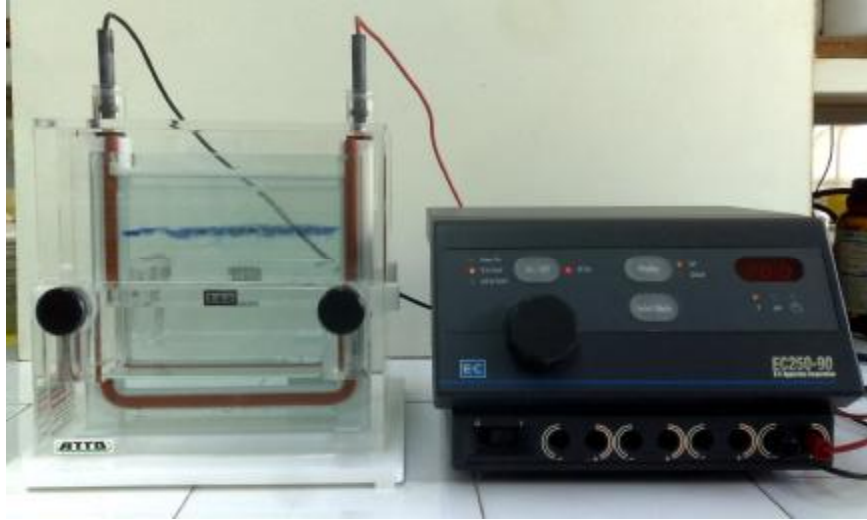
Polimerizasyonu sağlamak için 100 µl amonyum persülfat (% 10 w/v) ve 10 µl TEMED eklenerek bir pipet yardımıyla toplayıcı jelin üzerine dökülür. Jel tarağı yerleştirilerek donması için 45 dakika beklenir. Jel donduktan sonra tarak çıkarılarak yarısına kadar elektrot solüsyonu konmuş olan tankın içerisine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

3.2.3.3. Zimogram Analizi İçin SDS-PAGE Sisteminin Hazırlanması

CMCaz ve amilaz enzimlerinin zimogram analizleri CMC ve nişasta içeren SDS-PAGE 'de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla uygun konsantrasyonda hazırlanan jel karışımına %2'lik CMC (w/v) ve nişasta (w/v) çözeltilerinden 3 mL eklenerek polimerizasyon gerçekleştirilmiştir (Saul ve ark., 1990). Polimerizasyon işleminden sonraki uygulamalar standart SDS-PAGE uygulamasına göre yapılmıştır.

3.2.3.4. 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 durumlarda ise toplayıcı jelde 40 mA ve 100 V, ayırıcı jelde ise 60 mA ve 100 V'da çalıştırılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Bakterilere ait toplam proteinlerin SDS-PAGE’de elektroforezi

3.2.3.5. Protein Bantlarının Belirlenmesi

Proteinler jelin sonuna geldikten sonra güç kaynağında elektrik akımı kesilerek cam levhalar jele zarar vermeden dikkatlice çıkarılmıştır. Arasında jel bulunan iki cam dikkatlice birbirinden ayrılarak jel bir kabın içerisine konulmuş ve üzerini örtecek kadar stain (EK-2.18) boyama solüsyonu ilave edilerek jel bu boyada 45-60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında jel elle hafifçe sallanarak jelin boyayı iyice alması sağlanmıştır. Jel boyama solüsyonundan alınarak yıkama solüsyonu (EK-2.19) içerisine konmuş ve birkaç saat beklenmiştir.

3.2.3.6. SDS-CMC-PAGE Jelde CMCaz Aktivitesinin Tayini

CMCaz aktivitesinin belirlenmesi için SDS-CMC-PAGE (%0.2 CMC)’deki enzimlerin aktifleşmesi için renatürasyon solusyonu (50mM NaH_2PO_4 ve 50mM Na_2HPO_4 karıştırılarak pH 7.2’ye ayarlanmış, %20 izopropanol alkol) ile 1 saat çalkalanarak SDS’in uzaklaşması sağlanmıştır. Jel sodyum fosfat solusyonuna (50mM NaH_2PO_4 ve 50mM Na_2HPO_4 karıştırılarak pH 7.2’ye ayarlanmış) alınmış ve oda sıcaklığında 60 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tekrara sodyum fosfat solusyonuyla (50mM NaH_2PO_4 ve 50mM Na_2HPO_4 karıştırılarak pH 7.2’ye

ayarlanmış, 5 mM beta-merkapto etanol ve 1mM EDTA) muamele edilerek +4°C’de 1 gece tutulmuştur. Jel sodium fosfat solusyonundan çıkarılarak streç filme iyice sarılmış ve 4-5 saat 55°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyondan sonra jel Congo-red boyama solüsyonuyla yaklaşık 1 saat boyanmıştır. Daha sonra jel boyama solüsyonundan alınarak 1M NaCl ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmıştır. Bütün jel kırmızıya boyandığı halde etrafı boyanmayarak sarı renkte kalan bant CMCaz enziminden sorumlu banttır.

3.2.3.7. SDS-Nişasta-PAGE Jelde α -Amilaz Aktivitesinin Tayini

α -Amilaz aktivitesinin belirlenmesi için SDS-Nişasta-PAGE (%0.2 nişasta)’deki enzimlerin aktifleşmesi için renatürasyon solusyonu (50mM NaH₂PO₄ ve 50mM Na₂HPO₄ karıştırılarak pH 7.2’ye ayarlanmış, %20 izopropanol alkol) ile 1 saat çalkalanarak SDS’in uzaklaşması sağlanmıştır. Jel sodyum fosfat solusyonuna (50mM NaH₂PO₄ ve 50mM Na₂HPO₄ karıştırılarak pH 7.2’ye ayarlanmış) alınmış ve oda sıcaklığında 60 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tekrara sodyum fosfat solusyonuyla (50mM NaH₂PO₄ ve 50mM Na₂HPO₄ karıştırılarak pH 7.2’ye ayarlanmış, 5mM beta-merkapto etanol ve 1mM EDTA) muamele edilerek +4°C’de 1 gece tutulmuştur. Jel sodium fosfat solusyonundan çıkarılarak streç filme iyice sarılmış ve 4-5 saat 55°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda jel iyodin boyası ile (EK-2.2) 5-6 dakika boyanmış ve enzyme ait bantlar ortaya çıkarılmıştır (Lee ve ark., 1994).

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu

Alkalifilik, halofilik ve termofilik *Bacillus* sp. izolasyonu amacıyla Van Gölü, Orumiye Gölü ve Hazar Dnizinin farklı bölgelerinden alınmış toprak ve su örneklerinden 55°C sıcaklıkta, %5 NaCl ve pH:9'da gelişim gösteren bakterilerin izolasyonları yapılmıştır. İzolat *Bacillus* sp. suşları farklı sıcaklık, tuz ve pH koşullarında gelişim performanları belirlenmiştir (Tablo 4.1.).

Çizelge.4.1. İzolasyon sonunda seçilmiş *Bacillus* sp. suşları ve farklı koşullardaki enzimatik aktivite durumları

Suş	PH:9						PH:10						PH:11						Enzim		
	NACL: 0.5		NACL: 5		NACL: 10		NACL: 15		NACL: 5		NACL: 10		NACL: 15		NACL: 5		NACL: 10			NACL: 15	
	55°	65°	55°	65°	55°	65°	55°	65°	55°	65°	55°	65°	55°	65°	55°	65°	55°	65°		55°	65°
VA1-29	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	CMCaz
VA1-30	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	CMCaz
VA2-34	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	α-Amilaz
VA2-35	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	α-Amilaz
VA1-45	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	α-Amilaz CMCaz
VA1-47	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	α-Amilaz CMCaz
VA1-49	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	CMCaz
VA2-41	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	α-Amilaz
KH1-29	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	α-Amilaz

VA: Van Gölü
KH: Hazar Denizi

+++ → İyi düzeyde üreme
++ → Orta düzeyde üreme
+ → Zayıf düzeyde üreme

4.2. Van Gölün'den İzole Edilen *Bacillus* sp. VA1-29 Suşuna Ait Bulgular

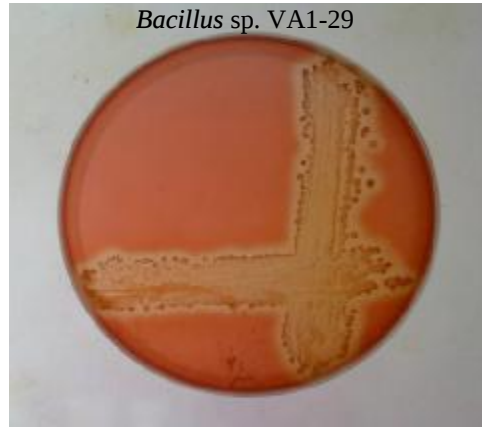
4.2.1. *Bacillus* sp. VA1-29 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler

Optimum üreme koşullarında (55°C, %5NaCl, pH:9) araştırması yapılan *Bacillus* sp. VA1-29 suşuna ait enzimlerin aktivite durumu Tablo 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Bacillus* sp. VA1-29 suşuna ait enzim profili

Enzim Suş	α -Amilaz	CMCaz	Ksilanaz	Likenaz	İnülinaz	Proteaz
VA1-29	-	+	-	-	-	-

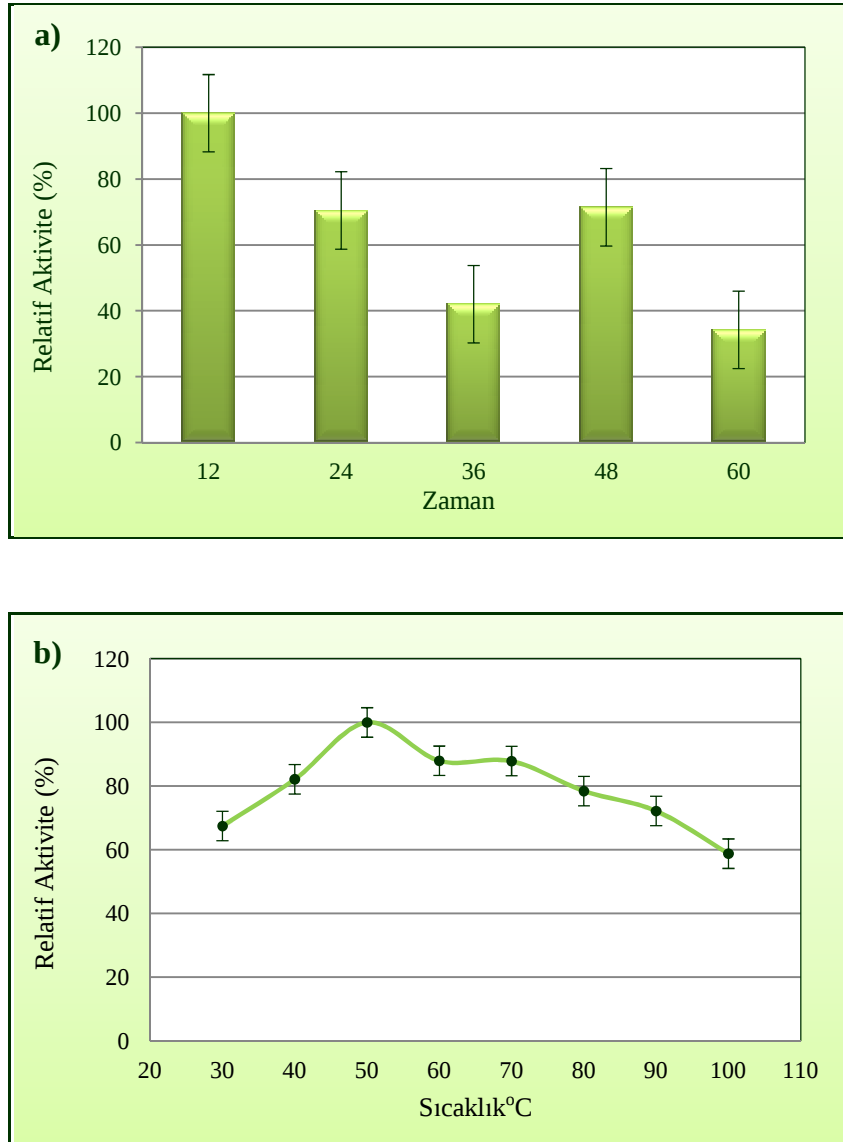
Tablodan anlaşılacağı üzere *Bacillus* sp. VA1-29 suşunun sadece CMCaz enzimini ürettiği belirlenmiştir. Bakteriye ait CMCaz enzim aktivite zonları LB-CMC-Agar besiyerinde Congo-red boyaması ile gösterilmiştir (Şekil 4.1.).

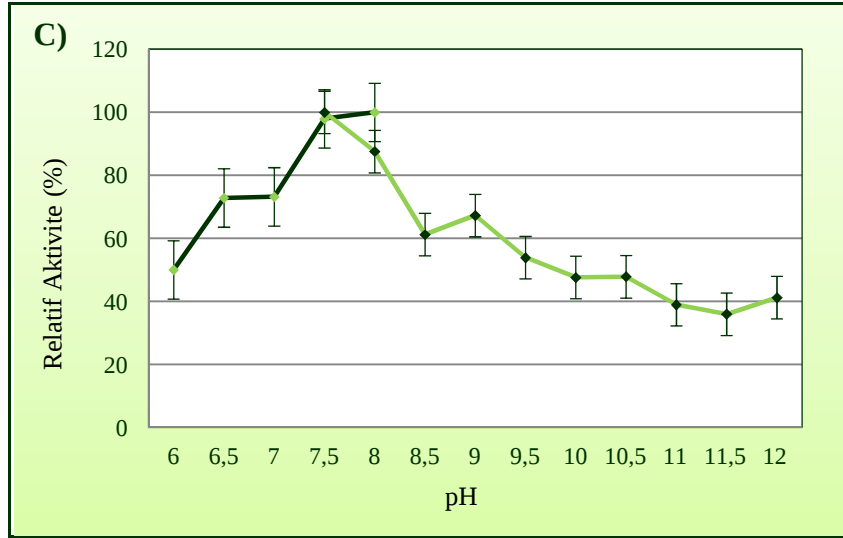


Şekil 4.1. *Bacillus* sp. VA1-29 izolatının LB/CMC/Agar'da CMCaz enzim aktivitesi

4.2.2. *Bacillus* sp. VA1-29 Suşu Tarafından Üretilen Enziminin Bazı Enzimatik Özellikleri

Bacillus sp. Va1-29 suşu tarafından CMCaz enziminin üretimi, bakterinin üreme periyodunun 12. saatinde maksimum düzeyde çıkmıştır (Şekil 4.2a). Enzimin, optimum aktivitesini 50°C ve pH 7.5-8.0 aralığında göstermiştir (Şekil 4.2b ve c)

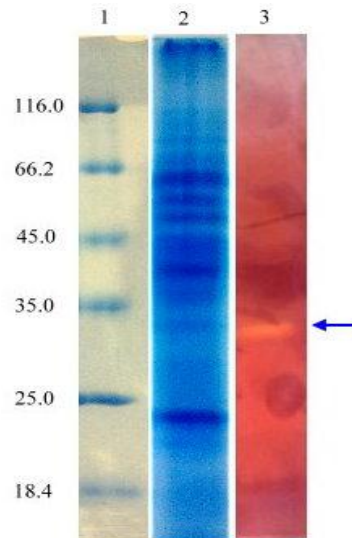




Şekil 4.2. *Bacillus sp. VA1-29* suşu tarafından üretilen CMCaz enzimine ait bazı özellikler (a: Zamana göre enzim aktivitesi grafiği, b: Farklı sıcaklık değerinde aktivite grafiği, c: Farklı pH değerlerinde aktivite grafiği)

4.2.3. *Bacillus sp. VA1-29*'un SDS-CMC-PAGE ve Zimogram Analizi

Bacillus sp. VA1-29 CMCaz enziminin zimogram analizi sonucu moleküler ağırlığı yaklaşık 33 kDa olan bant elde edilmiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. *Bacillus sp. VA1-29* izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü. 1: Markır 2: SDS-PAGE'de toplam protein profilleri 3: SDS-CMC-PAGE'de CMCaz enziminin zimogram analizi

4.3. Van Gölün'den İzole Edilen *Bacillus* sp. VA1-30 Suşuna Ait Bulgular

4.3.1. *Bacillus* sp. VA1-30 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler

Optimum üreme koşullarında (55°C, %5NaCl, pH:9) araştırması yapılan *Bacillus* sp. VA1-30 suşuna ait enzimlerin aktivite durumu Tablo 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. *Bacillus* sp. VA1-30 suşuna ait enzim profili

Enzim Suş	α -Amilaz	CMCaz	Ksilanaz	Likenaz	İnülinaz	Proteaz
VA1-30	-	+	-	-	-	-

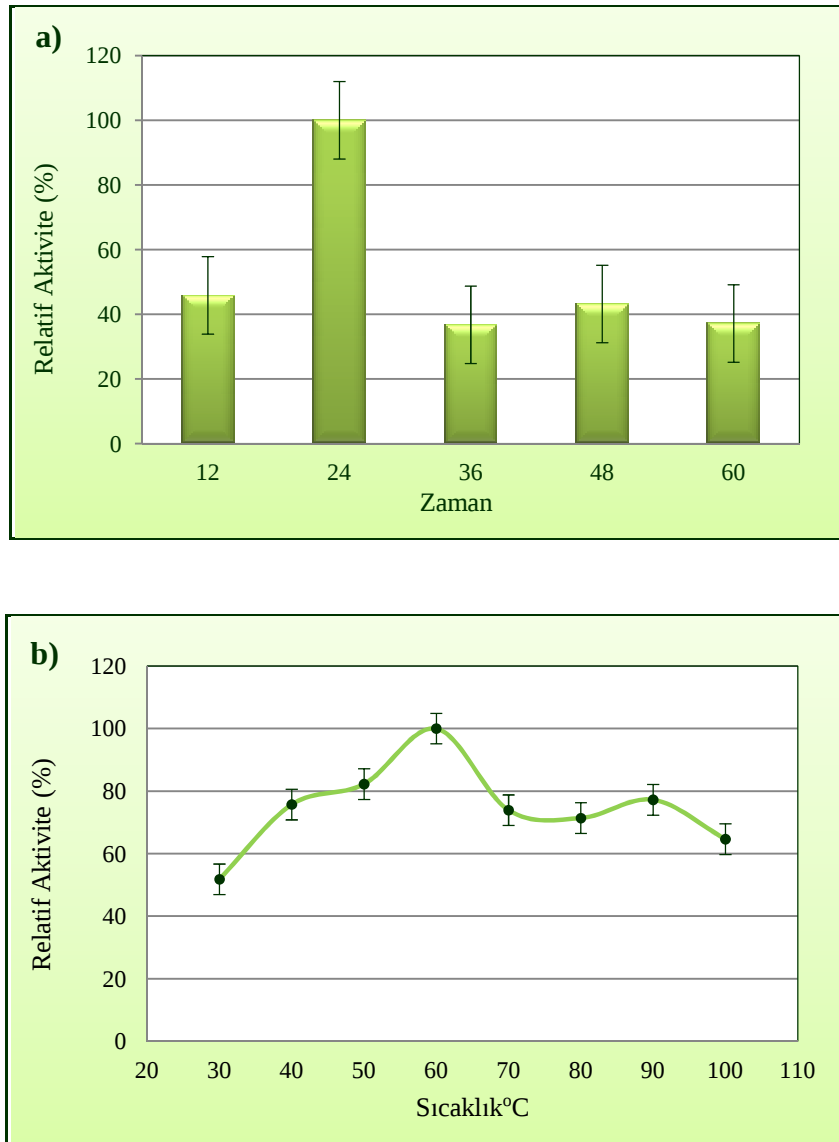
Tablodan anlaşılacağı üzere *Bacillus* sp. VA1-30 suşunun sadece CMCaz enzimini ürettiği belirlenmiştir. Bakteriye ait CMCaz enzim aktivite zonları LB-CMC-Agar besiyerinde Congo-red boyaması ile gösterilmiştir (Şekil 4.4.).

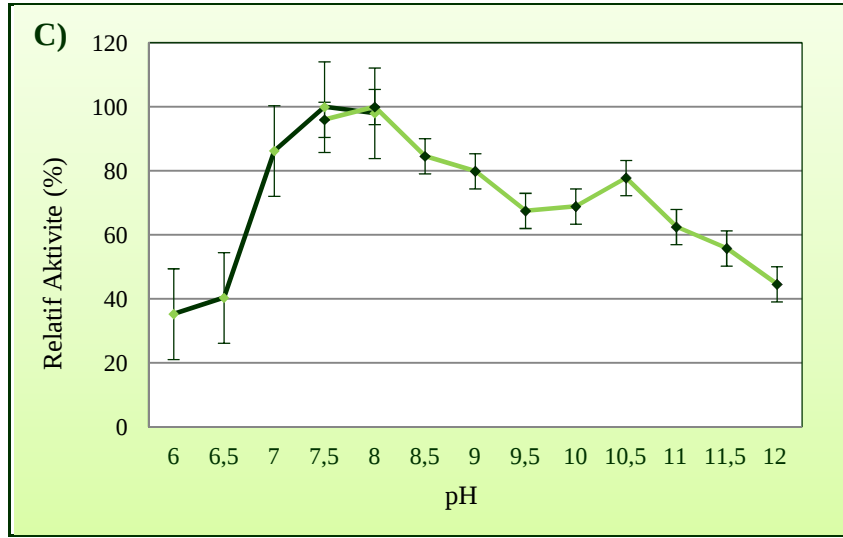


Şekil 4.4. *Bacillus* sp. VA1-30 izolatının LB/CMC/Agar'da CMCaz enzim aktivitesi

4.3.2. *Bacillus* sp. VA1-30 Suşu Tarafından Üretilen CMCaz Enziminin Bazı Enzimatik Özellikleri

Bacillus sp. Va1-30 suşu tarafından CMCaz enziminin üretimi, bakterinin üreme periyodunun 24. saatinde maksimum düzeyde çıkmıştır (Şekil 4.5a). Enzimin, optimum aktivitesini 60°C ve pH 7.0-9.0 aralığında göstermiştir (Şekil 4.5b ve c)

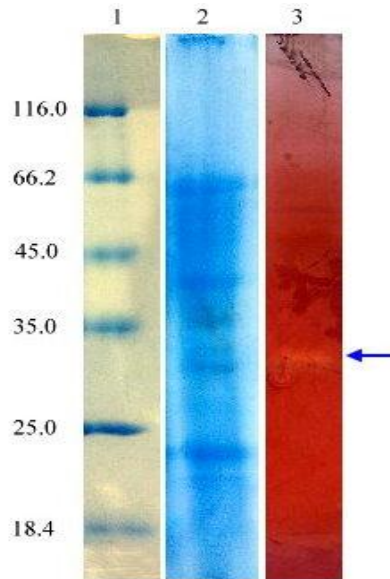




Şekil 4.5. *Bacillus* sp. VA1-30 suşu tarafından üretilen CMCaz enzimine ait bazı özellikler (a: Zamana göre enzim aktivitesi grafiği, b: Farklı sıcaklık değerinde aktivite grafiği, c: Farklı pH değerlerinde aktivite grafiği)

4.3.3. *Bacillus* sp. VA1-30'un SDS-CMC-PAGE ve Zimogram Analizi

Bacillus sp. VA1-30 CMCaz enziminin zimogram analizi sonucu moleküler ağırlığı yaklaşık 32 kDa olan bant elde edilmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. *Bacillus* sp. VA1-30 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü. 1: Markır 2: SDS-PAGE'de toplam protein profilleri 3: SDS-CMC-PAGE'de CMCaz enziminin zimogram analizi

4.4. Van Gölün'den İzole Edilen *Bacillus* sp. VA1-49 Suşuna Ait Bulgular

4.4.1. *Bacillus* sp. VA1-49 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler

Optimum üreme koşullarında (55°C, %5NaCl, pH:9) araştırması yapılan *Bacillus* sp. VA1-49 suşuna ait enzimlerin aktivite durumu Tablo 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. *Bacillus* sp. VA1-49 suşuna ait enzim profili

Enzim Suş	α -Amilaz	CMCaz	Ksilanaz	Likenaz	İnülinaz	Proteaz
VA1-49	-	+	-	-	-	-

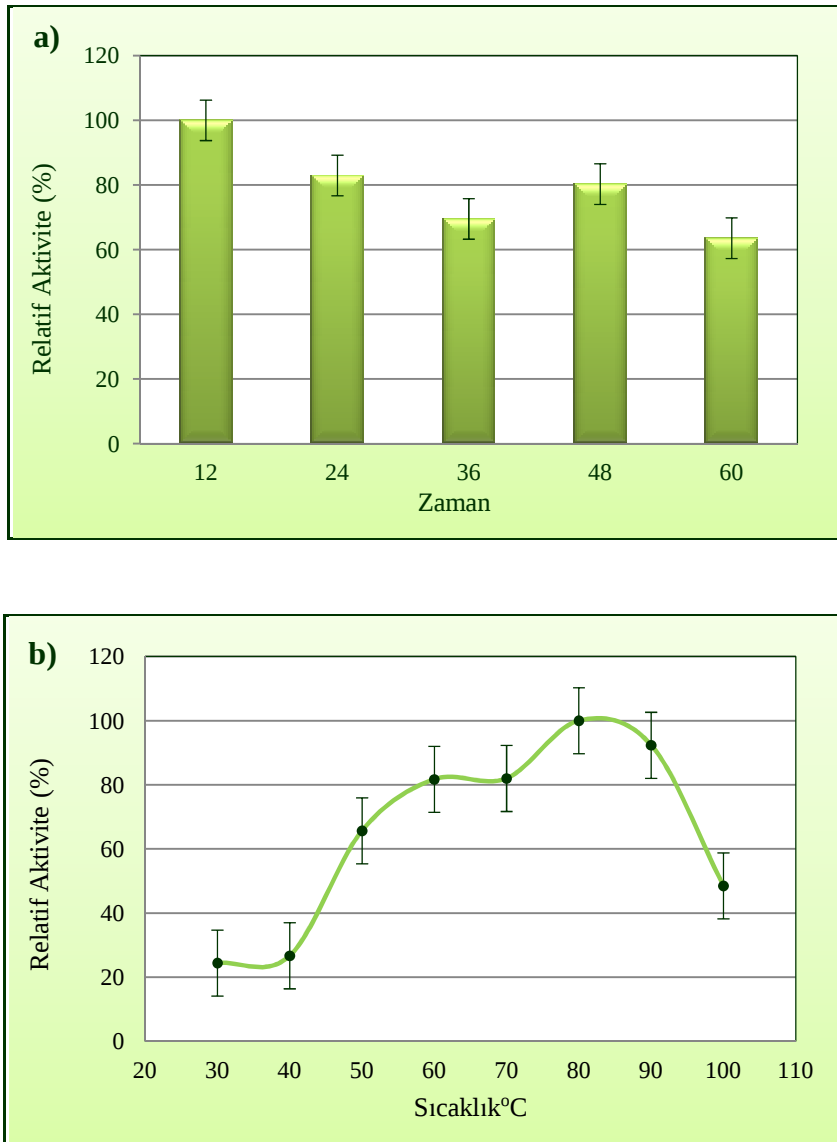
Tablodan anlaşılacağı üzere *Bacillus* sp. VA1-49 suşunun sadece CMCaz enzimini ürettiği belirlenmiştir. Bakteriye ait CMCaz enzim aktivite zonları LB-CMC-Agar besiyerinde Congo-red boyaması ile gösterilmiştir (Şekil 4.7.).

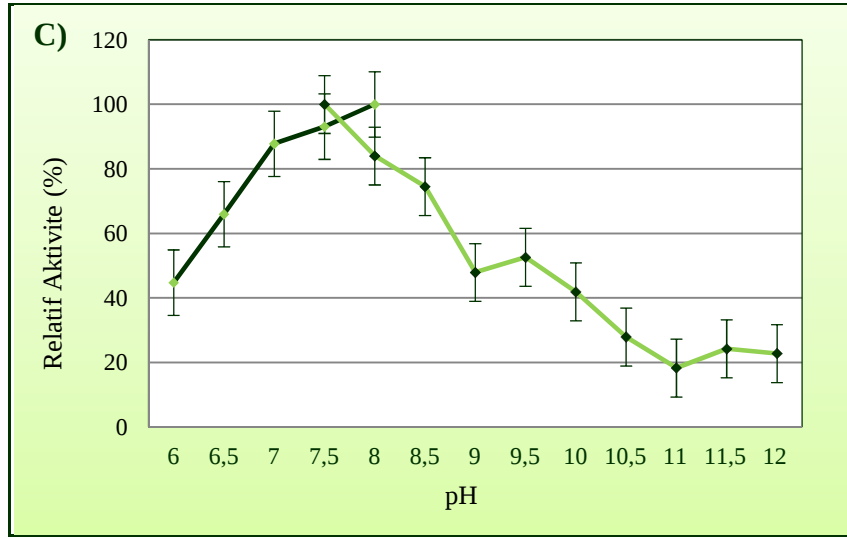


Şekil 4.7. *Bacillus* sp. VA1-49 izolatının LB/CMC/Agar'da CMCaz enzim aktivitesi

4.4.2. *Bacillus* sp. VA1-49 Suşu Tarafından Üretilen CMCase Enziminin Bazı Enzimatik Özellikleri

Bacillus sp. Va1-49 suşu tarafından CMCase enziminin üretimi, bakterinin üreme periyodunun 12. saatinde maksimum düzeyde çıkmıştır (Şekil 4.8a). Enzimin, optimum aktivitesini 80°C ve pH 7.0-8.5 aralığında göstermiştir (Şekil 4.8b ve c)

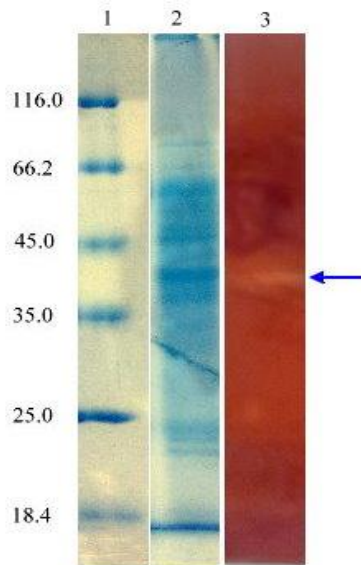




Şekil 4.8. *Bacillus* sp. VA1-49 suşu tarafından üretilen CMCaz enzimine ait bazı özellikler (a: Zamana göre enzim aktivitesi grafiği, b: Farklı sıcaklık değerinde aktivite grafiği, c: Farklı pH değerlerinde aktivite grafiği)

4.4.3. *Bacillus* sp. VA1-49'un SDS-CMC-PAGE ve Zimogram Analizi

Bacillus sp. VA1-49 CMCaz enziminin zimogram analizi sonucu moleküler ağırlığı yaklaşık 40 kDa olan bant elde edilmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. *Bacillus* sp. VA1-49 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü. 1: Markır 2: SDS-PAGE'de toplam protein profilleri 3: SDS-CMC-PAGE'de CMCaz enziminin zimogram analizi

4.5. Van Gölün'den İzole Edilen *Bacillus* sp. VA1-47 Suşuna Ait Bulgular

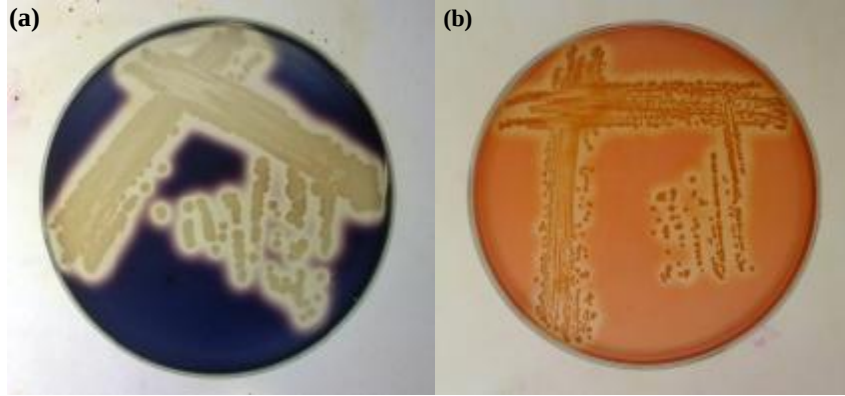
4.5.1. *Bacillus* sp. VA1-47 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler

Optimum üreme koşullarında (55°C, %5NaCl, pH:9) araştırması yapılan *Bacillus* sp. VA1-47 suşuna ait enzimlerin aktivite durumu Tablo 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. *Bacillus* sp. VA1-47 suşuna ait enzim profili

Enzim Suş	α -Amilaz	CMCaz	Ksilanaz	Likenaz	İnülinaz	Proteaz
VA1-47	+	+	-	-	-	-

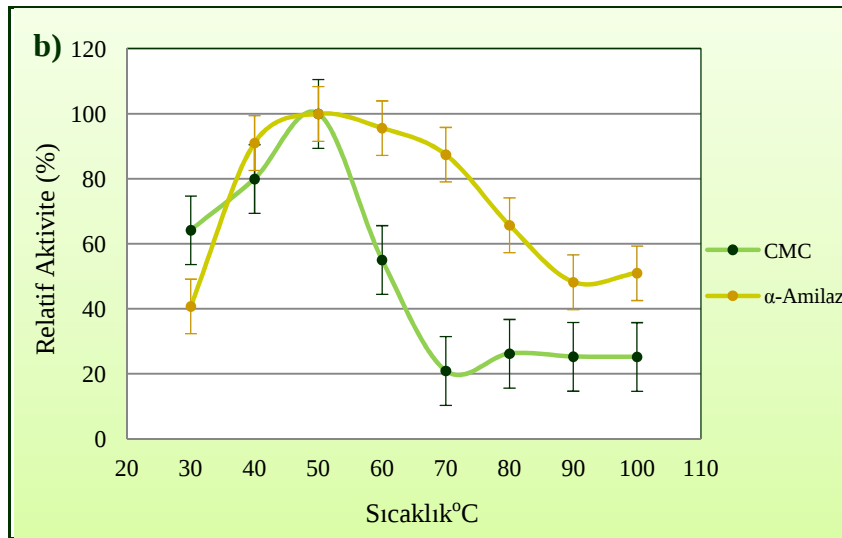
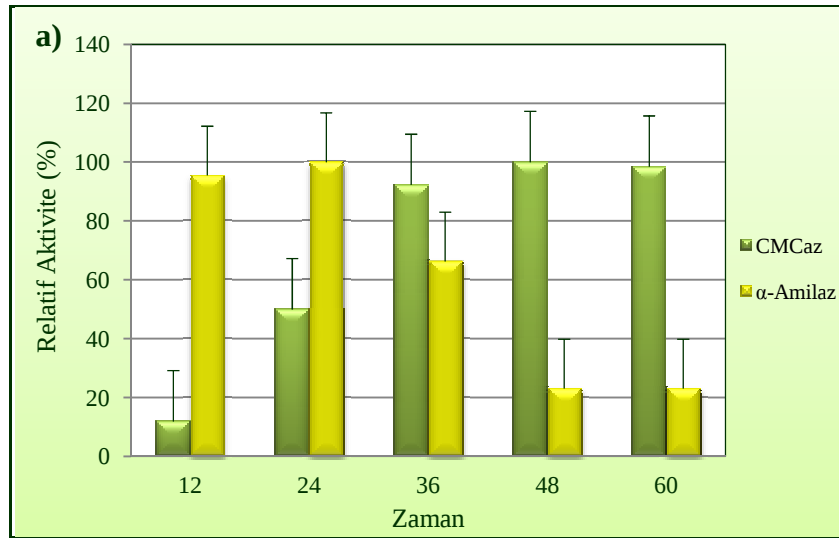
Tablodan anlaşılabacağı üzere *Bacillus* sp. VA1-47 suşunun α -amilaz ve CMCaz enzimlerin ürettiği belirlenmiştir. Bakteriye ait CMCaz enzim aktivite zonları LB-CMC-Agar besiyerinde Congo-red boyaması ve α -amilaz enzim aktivite zonları LB-Nişasta-Agar besiyerinde iyodin boyası ile gösterilmişlerdir. (Şekil 4.10.).

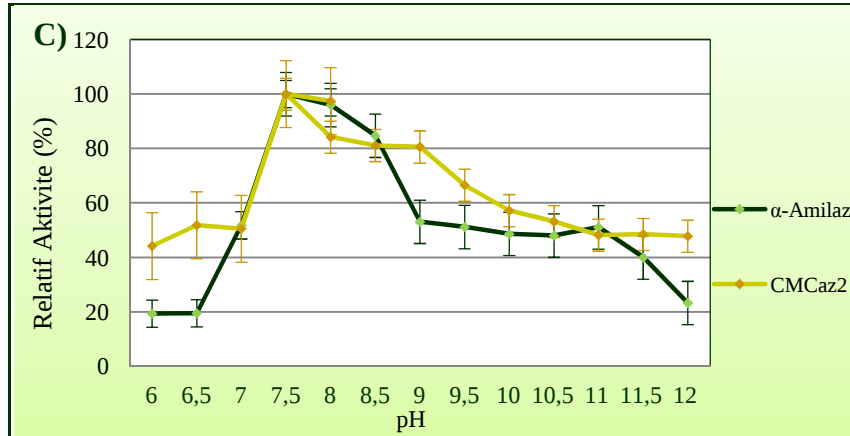


Şekil 4.10. *Bacillus* sp. VA1-47 izolatının LB/Nişasta-Agar (a) ve LB/CMC-Agar (b)'da α -Amilaz ve CMCaz enzim aktiviteleri

4.5.2. *Bacillus* sp. VA1-47 Suşu Tarafından Üretilen CMCaz ve α -Amilaz Enzimlerin Bazı Enzimatik Özellikleri

Bacillus sp. Va1-47 suşu tarafından CMCaz enziminin üretimi, bakterinin üreme periyodunun 4 8.saatinde ve α -amilaz üreme periyodunun 24.saatinde maksimum düzeyde çıkmıştır (Şekil 4.11a). Enzimin, optimum aktivitesini 50°C ve CMCaz pH 7.5-9.0, α -amilaz pH 7.5-8.5 aralığında göstermiştir (Şekil 4.11b ve c).

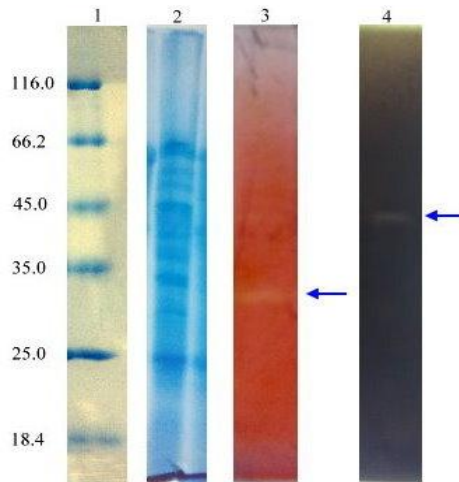




Şekil 4.11. *Bacillus* sp. VA1-47 suşu tarafından üretilen CMCaz ve α -amilaz enzimlerine ait bazı özellikler (a: Zamana göre enzim aktivitesi grafiği, b: Farklı sıcaklık değerinde aktivite grafiği, c: Farklı pH değerlerinde aktivite grafiği)

4.5.3. *Bacillus* sp. VA1-47'nin SDS-CMC-PAGE SDS-Nişasta-PAGE'de Zimogram Analizi

Bacillus sp. VA1-47 suşu tarafından üretilen α -amilaz ve CMCaz enzimlerinin zimogram analizleri sonucu moleküler ağırlıkları sırasıyla 45 kDa ve 32 kDa olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. *Bacillus* sp. VA1-47 suşuna ait CMCaz ve α -amilaz Enzimlerinin SDS-PAGE ve zimogram analiz görüntüsü. 1: Markır 2: Toplam proteinlerine ait SDS-PAGE'deki bant profilleri 3: SDS-CMC-PAGE'de CMCaz enziminin zimogram analizi 4: SDS-Nişasta-PAGE'de α -amilaz enziminin zimogram analizi

4.6. Van Gölün'den İzole Edilen *Bacillus* sp. VA1-45 Suşuna Ait Bulgular

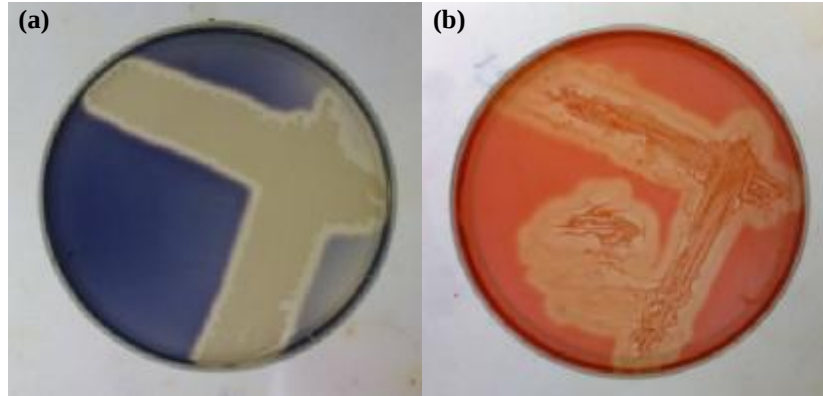
4.6.1. *Bacillus* sp. VA1-45 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler

Optimum üreme koşullarında (55°C, %5NaCl, pH: 9) araştırması yapılan *Bacillus* sp. VA1-45 suşuna ait enzimlerin aktivite durumu Tablo 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. *Bacillus* sp. VA1-45 suşuna ait enzim profili

Enzim Suş	α -Amilaz	CMCaz	Ksilanaz	Likenaz	İnülinaz	Proteaz
VA1-45	+	+	-	-	-	-

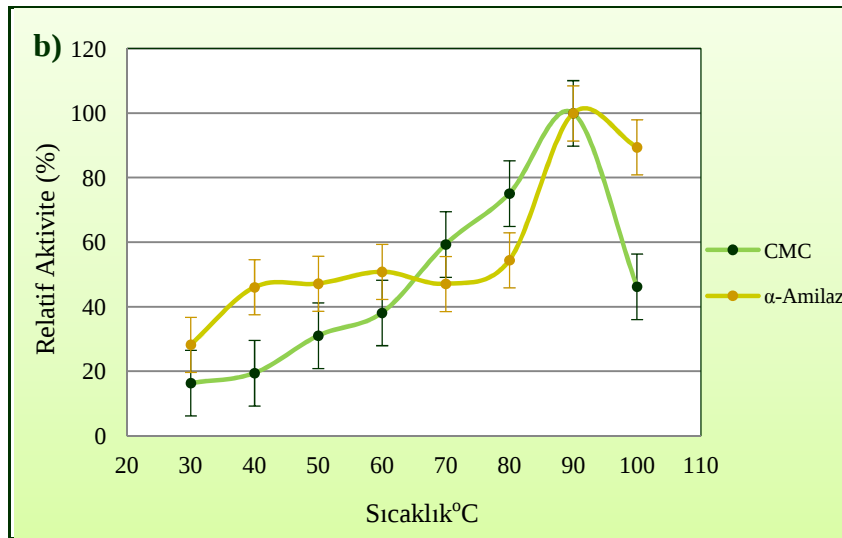
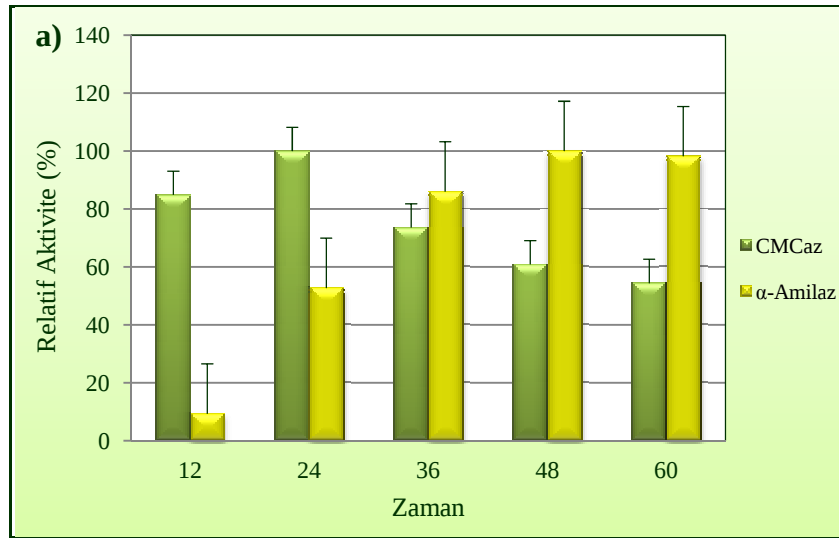
Tablodan anlaşılabacağı üzere *Bacillus* sp. VA1-45 suşunun α -amilaz ve CMCaz enzimlerin ürettiği belirlenmiştir. Bakteriye ait CMCaz enzim aktivite zonları LB-CMC-Agar besiyerinde Congo-red boyaması ve α -amilaz enzim aktivite zonları LB-Nişasta-Agar besiyerinde iyodin boyası ile gösterilmişlerdir. (Şekil 4.13.).

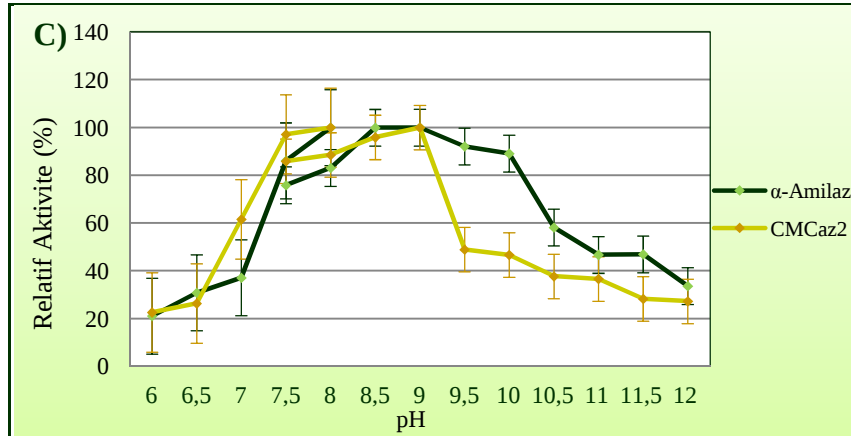


Şekil 4. 13. *Bacillus* sp. VA1-45 izolatının LB/Nişasta/Agar (a) ve LB/CMC/Agar (b)'da α -amilaz ve CMCaz enzim aktiviteleri

4.6.2. *Bacillus* sp. VA1-45 Suşu Tarafından Üretilen CMCaz ve α -Amilaz Enzimlerin Bazı Enzimatik Özellikleri

Bacillus sp. Va1-45 suşu tarafından CMCaz enziminin üretimi, bakterinin üreme periyodunun 24. saatinde ve α -amilaz üreme periyodunun 48.saatinde maksimum düzeyde çıkmıştır (Şekil 4.14a). Enzimin, optimum aktivitesini 90°C ve CMCaz pH 7.5-9.0, α -Amilaz pH 7.5-10 aralığında göstermiştir (Şekil 4.14b ve c).

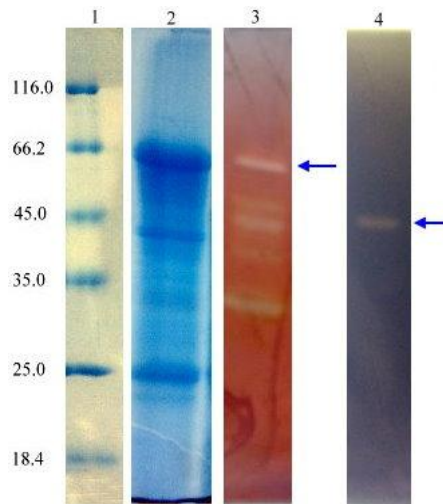




Şekil 4.14. *Bacillus* sp. VA1-45 suşu tarafından üretilen CMCaz ve α -amilaz enzimlerine ait bazı özellikler (a: Zamana göre enzim aktivitesi grafiği, b: Farklı sıcaklık değerinde aktivite grafiği, c: Farklı pH değerlerinde aktivite grafiği)

4.6.3. *Bacillus* sp. VA1-45'in SDS-CMC-PAGE SDS-Nişasta-PAGE'de Zimogram Analizi

Bacillus sp. VA1-45 suşu tarafından üretilen α -amilaz ve CMCaz enzimlerinin zimogram analizleri sonucu moleküler ağırlıkları sırasıyla 45 kDa ve 66 kDa olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. *Bacillus* sp. VA1-45 suşuna ait CMCaz ve α -amilaz Enzimlerinin SDS-PAGE ve zimogram analiz görüntüsü. 1: Markır 2: Toplam proteinlerine ait SDS-PAGE'deki bant profilleri 3: SDS-CMC-PAGE'de CMCaz enziminin zimogram analizi 4: SDS-Nişasta-PAGE'de α -amilaz enziminin zimogram analizi

4.7. Hazar Denizin'den İzole Edilen *Bacillus* sp. KH1-29 Suşuna Ait Bulgular

4.7.1. *Bacillus* sp. KH1-29 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler

Optimum üreme koşullarında (55°C, %5NaCl, pH: 9) araştırması yapılan *Bacillus* sp. KH1-29 suşuna ait enzimlerin aktivite durumu Tablo 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. *Bacillus* sp. KH1-29 suşuna ait enzim profili

Enzim Suş	α -Amilaz	CMCaz	Ksilanaz	Likenaz	İnülinaz	Proteaz
KH1-29	+	-	-	-	-	-

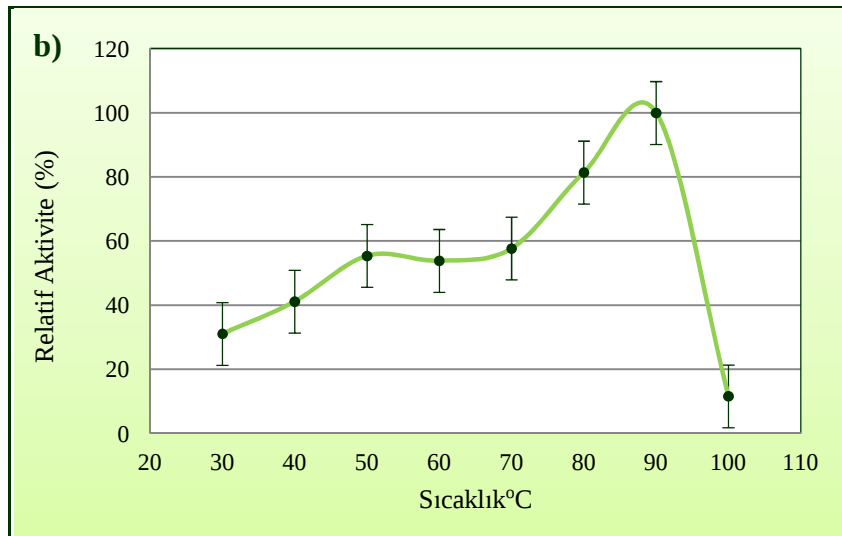
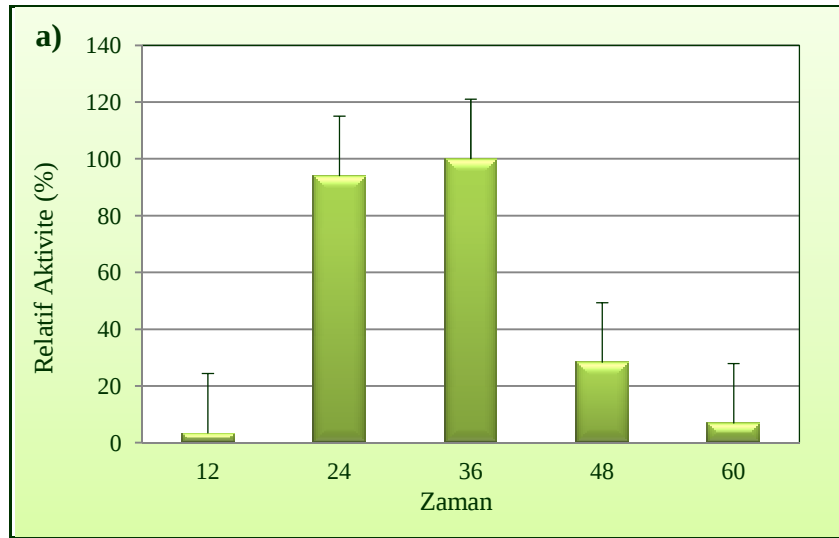
Tablodan anlaşılacağı üzere *Bacillus* sp. KH1-29 suşunun sadece α -amilaz enzimini ürettiği belirlenmiştir. Bakteriye ait α -amilaz enzim aktivite zonları LB-Nişasta-Agar besiyerinde iyodin boyası ile gösterilmiştir (Şekil 4.16.).

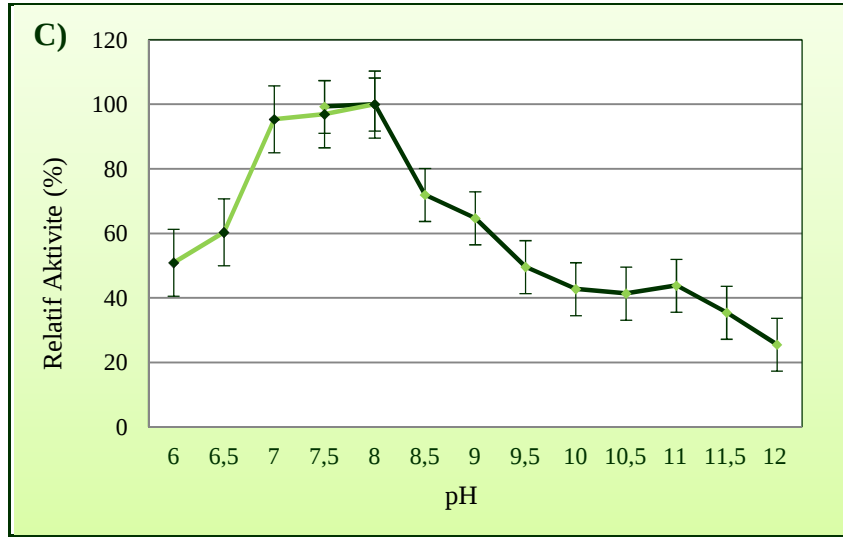


Şekil 4.16. *Bacillus* sp. KH1-29 izolat tarafından üretilen α -amilaz enziminin LB-Nișasta-Agar'da iyodin boyaması ile gösterilmesi

4.7.2. *Bacillus* sp. KH1-29 Suşu Tarafından Üretilen α -Amilaz Enziminin Bazı Enzimatik Özellikleri

Bacillus sp. KH1-29 suşu tarafından α -Amilaz enziminin üretimi, bakterinin üreme periyodunun 36. saatinde maksimum düzeyde çıkmıştır (Şekil 4.17a). Enzimin, optimum aktivitesini 90°C ve pH 7.0-8.0 aralığında göstermiştir (Şekil 4.17b ve c)

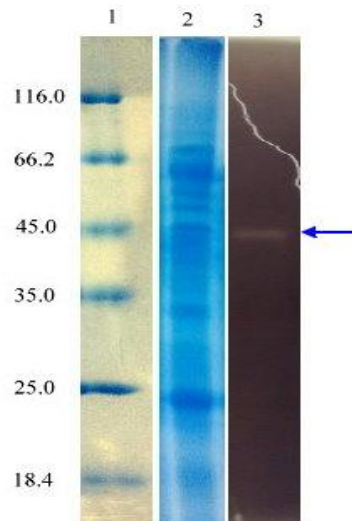




Şekil 4.17. *Bacillus* sp. KH1-29 suşu tarafından üretilen α -amilaz enzimine ait bazı özellikler (a: Zamana göre enzim aktivitesi grafiği, b: Farklı sıcaklık değerinde aktivite grafiği, c: Farklı pH değerlerinde aktivite grafiği)

4.7.3. *Bacillus* sp. KH1-29'un SDS-Nişasta-PAGE ve Zimogram Analizi

Bacillus sp. KH1-29 α -amilaz enziminin zimogram analizi sonucu moleküler ağırlığı yaklaşık 45 kDa olan tek bir bant elde edilmiştir (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. *Bacillus* sp. KH1-29 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü. 1: Markır 2: SDS-PAGE'de toplam protein profilleri 3: SDS-Nişasta-PAGE'de α -amilaz enziminin zimogram analizi

4.8. Van Gölün'den İzole Edilen *Bacillus* sp. VA2-34 Suşuna Ait Bulgular

4.8.1. *Bacillus* sp. VA2-34 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler

Optimum üreme koşullarında (55°C, %5NaCl, pH: 9) araştırması yapılan *Bacillus* sp. VA2-34 suşuna ait enzimlerin aktivite durumu Tablo 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. *Bacillus* sp. VA2-34 suşuna ait enzim profili

Enzim Suş	α -Amilaz	CMCaz	Ksilanaz	Likenaz	İnülinaz	Proteaz
VA2-34	+	-	-	-	-	-

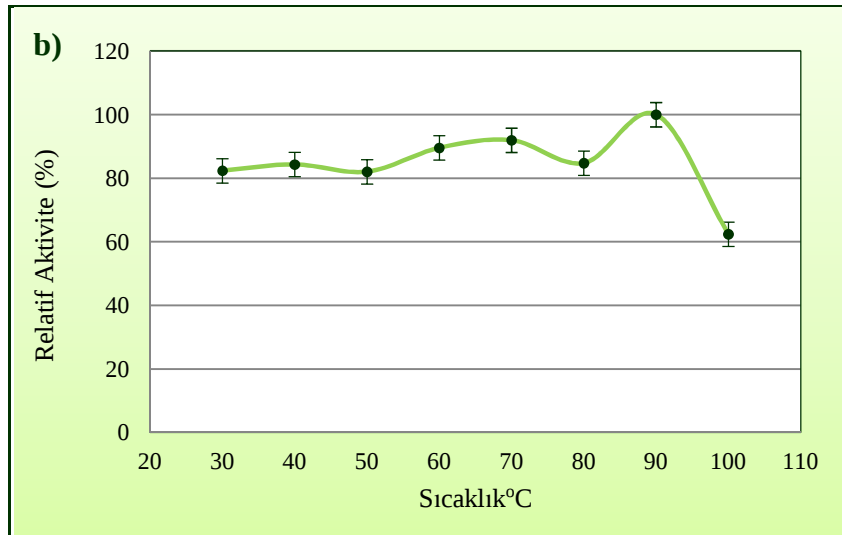
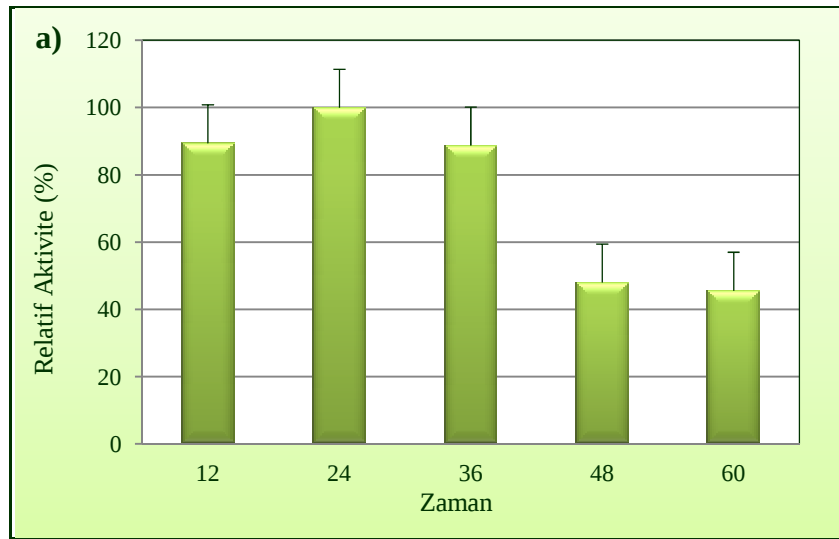
Tablodan anlaşılacağı üzere *Bacillus* sp. VA2-34 suşunun sadece α -amilaz enzimini ürettiği belirlenmiştir. Bakteriye ait α -amilaz enzimine ait aktivite zonları LB-Nişasta-Agar besiyerinde iyodin boyası ile gösterilmiştir (Şekil 4.19).

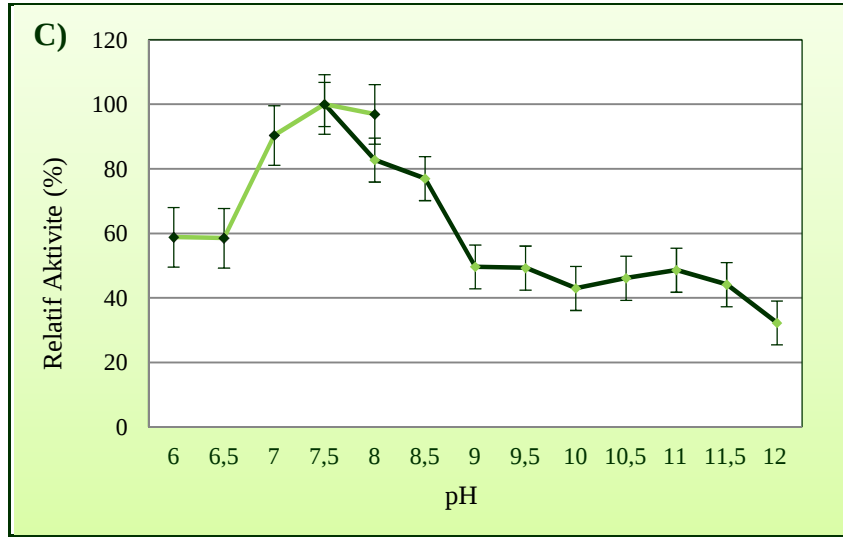


Şekil 4.19. *Bacillus* sp. VA2-34 izolatu tarafından üretilen α -amilaz enziminin LB-Nișasta-Agar'da iyodin boyaması ile gösterilmesi aktivitesi

4.8.2. *Bacillus* sp. VA2-34 Suşu Tarafından Üretilen α -Amilaz Enziminin Bazı Enzimatik Özellikleri

Bacillus sp. VA2-34 suşu tarafından α -amilaz enziminin üretimi, bakterinin üreme periyodunun 24. saatinde maksimum düzeyde çıkmıştır (Şekil 4.20a). Enzimin, optimum aktivitesini 90°C ve pH 7-8.5 aralığında göstermiştir (Şekil 4.20b ve c).

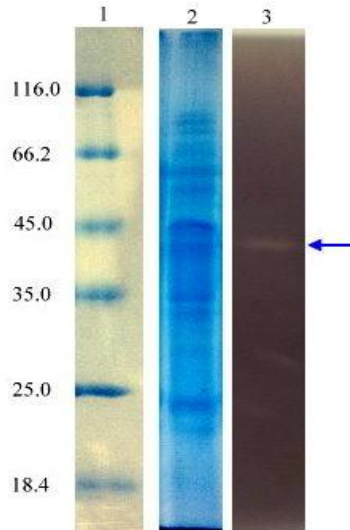




Şekil 4.20. *Bacillus* sp. VA2-34 suşu tarafından üretilen α -amilaz enzimine ait bazı özellikler (a: Zamana göre enzim aktivitesi grafiği, b: Farklı sıcaklık değerinde aktivite grafiği, c: Farklı pH değerlerinde aktivite grafiği)

4.8.3. *Bacillus* sp. VA2-34'ün SDS-Nişasta-PAGE ve Zimogram Analizi

Bacillus sp. VA2-34 α -amilaz enziminin zimogram analizi sonucu moleküler ağırlığı yaklaşık 44 kDa olan tek bir bant elde edilmiştir (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. *Bacillus* sp. VA2-34 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü. 1: Markır 2: SDS-PAGE'de toplam protein profilleri 3: SDS-Nişasta-PAGE'de α -amilaz enziminin zimogram analizi

4.9. Van Gölün'den İzole Edilen *Bacillus* sp. VA2-35 Suşuna Ait Bulgular

4.9.1. *Bacillus* sp. VA2-35 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler

Optimum üreme koşullarında (55°C, %5NaCl, pH: 9) araştırması yapılan *Bacillus* sp. VA2-35 suşuna ait enzimlerin aktivite durumu Tablo 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. *Bacillus* sp. VA2-35 suşuna ait enzim profili

Enzim Suş	α -Amilaz	CMCaz	Ksilanaz	Likenaz	İnülinaz	Proteaz
VA2-35	+	-	-	-	-	-

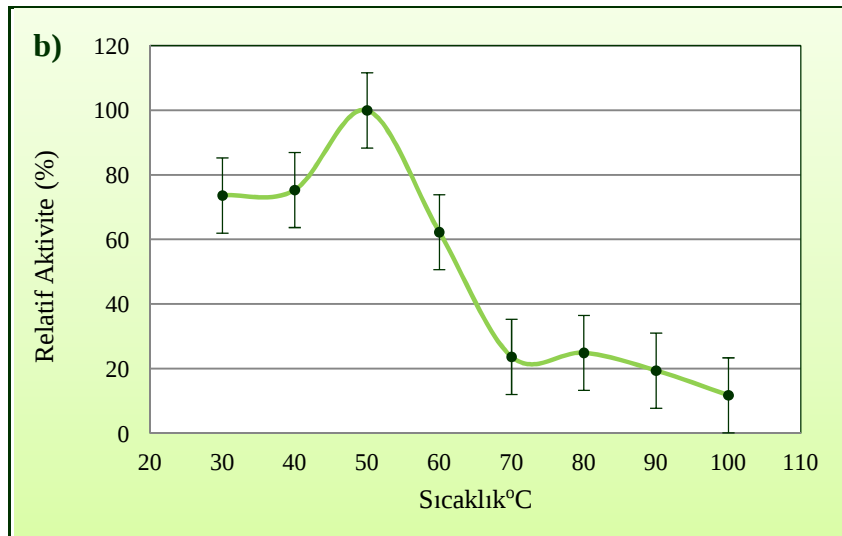
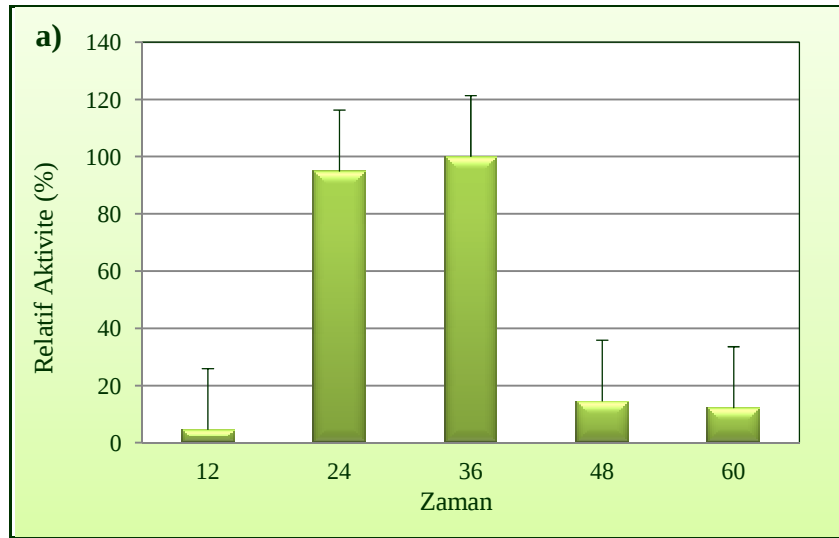
Tablodan anlaşılaacağı üzere *Bacillus* sp. VA2-35 suşunun sadece α -amilaz enzimini ürettiği belirlenmiştir. Bakteriye ait α -amilaz enzim aktivite zonları LB-Nişasta-Agar besiyerinde iyodin boyası ile gösterilmiştir (Şekil 4.22.).

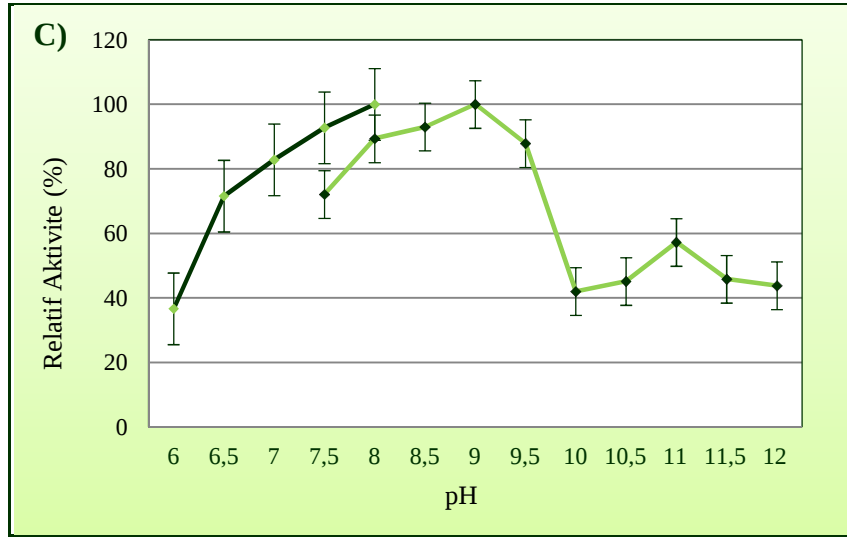


Şekil 4.22. *Bacillus* sp. VA2-35 izolatu tarafından üretilen α -amilaz enziminin LB-Nişasta-Agar'da iyodin boyaması ile gösterilmesi aktivitesi

4.9.2. *Bacillus* sp. VA2-35 Suşu Tarafından Üretilen α -Amilaz Enziminin Bazı Enzimatik Özellikleri

Bacillus sp. VA2-35 suşu tarafından α -amilaz enziminin üretimi, bakterinin üreme periyodunun 36. saatinde maksimum düzeyde çıkmıştır (Şekil 4.23a). Enzimin, optimum aktivitesini 50°C ve pH 6.5-9.5 aralığında göstermiştir (Şekil 4.23b ve c)

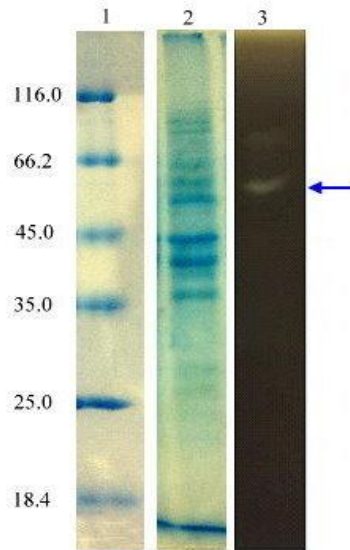




Şekil 4.23. *Bacillus* sp. VA2-35 suşu tarafından üretilen α -amilaz enzimine ait bazı özellikler (a: Zamana göre enzim aktivitesi grafiği, b: Farklı sıcaklık değerinde aktivite grafiği, c: Farklı pH değerlerinde aktivite grafiği)

4.9.3. *Bacillus* sp. VA2-35'in SDS-Nişasta-PAGE ve Zimogram Analizi

Bacillus sp. VA2-35 α -amilaz enziminin zimogram analizi sonucu SDS-Nişasta-PAGE'de moleküler ağırlığı yaklaşık 60 kDa olan bant elde edilmiştir (Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. *Bacillus* sp. VA2-35 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü. 1: Markır 2: SDS-PAGE'de toplam protein profilleri 3: SDS-Nişasta-PAGE'de α -amilaz enziminin zimogram analizi

4.10. Van Gölün'den İzole Edilen *Bacillus* sp. VA2-41 Suşuna Ait Bulgular

4.10.1. *Bacillus* sp. VA2-41 Suşun Tarafından Üretilen Enzimler

Optimum üreme koşullarında (55°C, %5NaCl, pH:9) araştırması yapılan *Bacillus* sp. VA2-41 suşuna ait enzimlerin aktivite durumu Tablo 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. *Bacillus* sp. VA2-41 suşuna ait enzim profili

Enzim Suş	α -Amilaz	CMCaz	Ksilanaz	Likenaz	İnülinaz	Proteaz
VA2-41	+	-	-	-	-	-

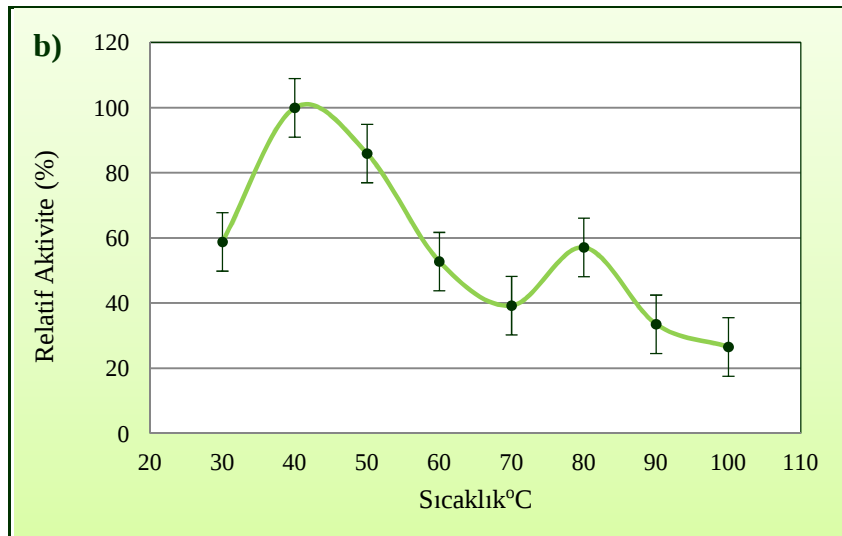
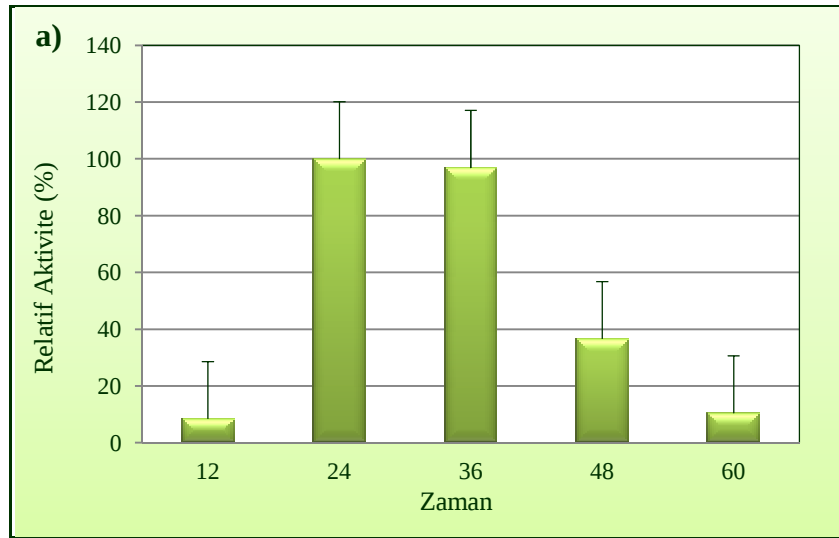
Tablodan anlaşılacağı üzere *Bacillus* sp. VA2-41 suşunun sadece α -amilaz enzimini ürettiği belirlenmiştir. Bakteriye ait α -amilaz enzim aktivite zonları LB-Nişasta-Agar besiyerinde iyodin boyası ile gösterilmiştir (Şekil 4.25.).

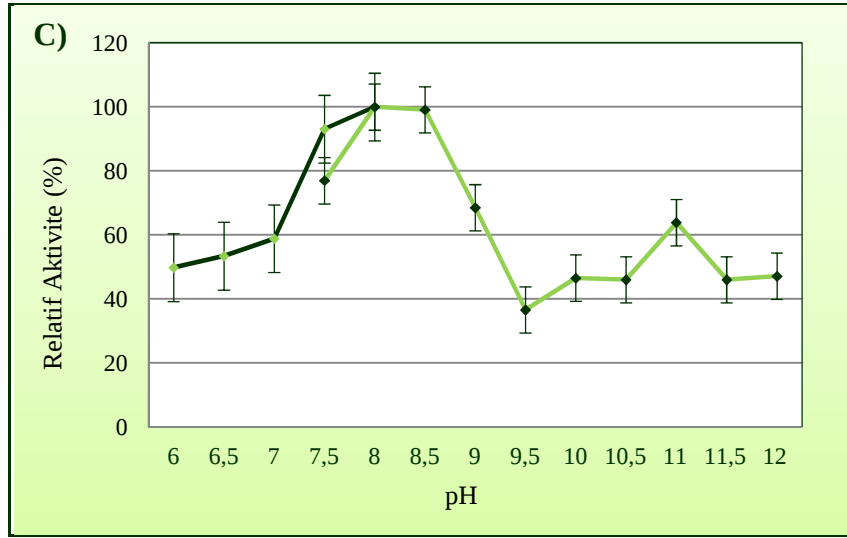


Şekil 4.25. *Bacillus* sp. VA2-41 izolatu tarafından üretilen α -amilaz enziminin LB-Nișasta-Agar'da iyodin boyaması ile gösterilmesi aktivitesi

4.10.2. *Bacillus* sp. VA2-41 Suşu Tarafından Üretilen α -Amilaz Enziminin Bazı Enzimatik Özellikleri

Bacillus sp. VA2-41 suşu tarafından α -amilaz enziminin üretimi, bakterinin üreme periyodunun 36. saatinde maksimum düzeyde çıkmıştır (Şekil 4.26a). Enzimin, optimum aktivitesini 40°C ve pH 7.5-8.5 aralığında göstermiştir (Şekil 4.26b ve c)

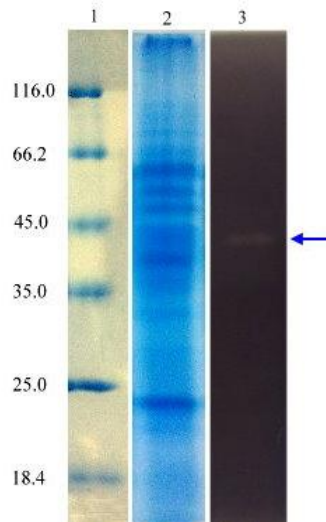




Şekil 4.26. *Bacillus* sp. VA2-41 suşu tarafından üretilen α -amilaz enzimine ait bazı özellikler (a: Zamana göre enzim aktivitesi grafiği, b: Farklı sıcaklık değerinde aktivite grafiği, c: Farklı pH değerlerinde aktivite grafiği)

4.10.3. *Bacillus* sp. VA2-41'in SDS-Nişasta-PAGE ve Zimogram Analizi

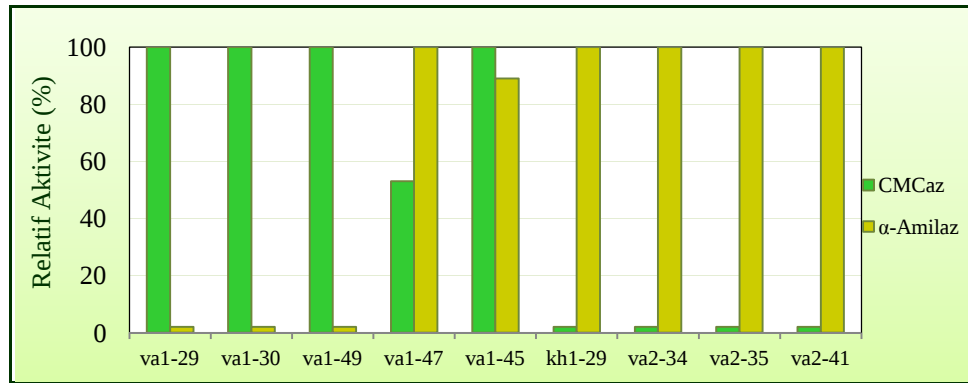
Bacillus sp. VA2-41 α -amilaz enziminin zimogram analizi sonucu SDS-Nişasta-PAGE'de moleküler ağırlığı yaklaşık 44 kDa olan bant elde edilmiştir (Şekil 4.27.).



Şekil 4.27. *Bacillus* sp. VA2-41 izolatına ait SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüdü. 1: Markır 2: SDS-PAGE'de toplam protein profilleri 3: SDS-Nişasta-PAGE'de α -amilaz enziminin zimogram analizi

4.11. İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarının Farklı Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması

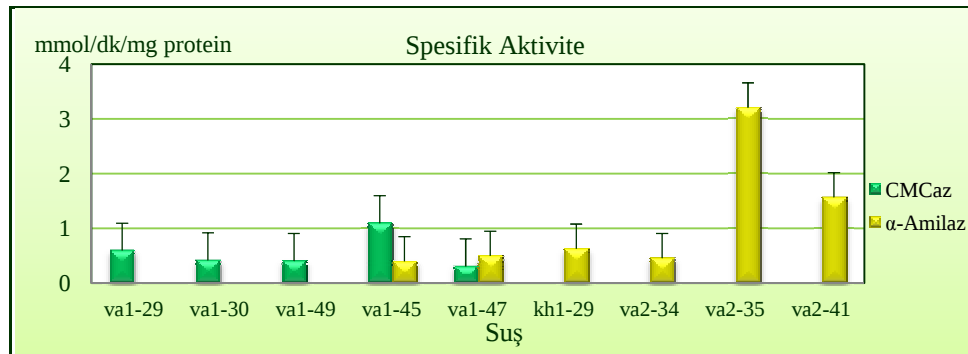
İzolasyonları yapılan alkalifilik, termofilik ve halofilik *Bacillus* sp. suşlarının farklı enzim aktivitelerinin karşılaştırması amacıyla substratlar enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık ve pH değerlerinde 30 dakika boyunca su banyosunda reaksiyona tabi tutulmuşlardır. Bütün suşların substrat spesifite değerleri Şekil.4.28’de gösterilmiştir.



Şekil.4.28. İzole edilen *Bacillus* sp. suşlarının farklı enzim aktivitelerinin karşılaştırması

4.12. İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarının Spesifik Aktiviteleri

İzole edilen *Bacillus* sp. suşlarının toplam proteinleri Lowry (1951) metoduna göre analiz edilerek her bir suşa ait 1 mg proteinin 1 dakikada ne kadar substratı parçaladığı belirlenmiştir (Şekil.4.29).



Şekil.4.29. *Bacillus* sp. Suşlarının spesifik aktiviteleri

4.13. Tartışma

4.13.1. CMCaz

CMCaz enzimi üreten bakterilerin yapılan analiz sonuçlarında *Bacillus* sp. VA1-29'un 12. saatte maksimum aktivite seviyesine ulaştığı, enziminin optimum aktivitesini 50 °C'de gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus* sp. VA1-30'un 24. saatte maksimum aktivite seviyesine ulaştığı ve enziminin optimum aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değeri 60 °C'de gösterdiği belirlenmiştir. VA1-49 suşunun ürettiği CMCaz enzimin ise 12. saatte maksimum aktivite göstermiş, optimum aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değeri 80 °C olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte enzimin inkübasyon sıcaklığı 40-50 °C aralığında %40 yükselme göstermiştir. *Bacillus* sp. VA1-45 nolu bakterinin 2 enzim (CMC ve α -amilaz) üretimi saptanmıştır. CMCaz enzimi 24. saatte ve α -amilaz enzimi bir yan enzim olarak 48-60 saatler aralığında optimum aktivite göstermiş ve optimum sıcaklığı 90 °C olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte CMCaz enzimin inkübasyon sıcaklığı 80 °C'ye yükseltildiği zaman aktivitesi % 46 düzeyine artmıştır. α -Amilaz enzimi 90 °C'den sonra aktivitesinin %54 düzeyinde düştüğü gözlenmiştir.

Robson ve Chambliss (1984), *Bacillus* sp. izolatından elde edilen CMCaz enziminin aktivite analizini yapmışlar ve maksimum CMCaz aktivitesini 58 °C'de gerçekleştiğini bulmuşlardır. Hakamada ve ark (1997), alkalifilik *Bacillus* sp. KSM-S237'den izole edilmiş termostabil alkali selülozün optimum sıcaklık aktivitesini 45°C'de gösterdiği bildirmişlerdir. Lin ve ark. (1998), *Bacillus* sp. TS- 23 suşunda enzim üretme yeteneğinin 42- 60 °C sıcaklıkta, en iyi enzim sentezinin ise optimum 55 °C'de olduğunu bulmuşlardır. Mawadza ve ark. (2000), izolasyonunu yaptıkları *Bacillus* sp. CH43 suşu için optimum sıcaklık değerini 70 °C ve *Bacillus* sp. HR68 için ise 65 °C olduğunu belirlemişlerdir. Kim ve ark (2005), alkalifilik *Bacillus* sp. suşundan HSH-810'dan alkali selüloz izolasyonu yapmışlar ve enzimin 50°C'de optimum aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Hirasawa ve ark. (2006), alkalifilik *Bacillus agaradhaerens* suşundan izole edilen endoglukanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığının 60°C olduğunu bulmuşlardır. Kang ve ark. (2007),

Pyrococcus horikoshii'den, (CMCaz) izolasyonu gerçekleştirmişler. Enzimin optimum 90 °C de aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Oyekola ve ark. (2007), izolasyonunu yaptıkları endoglukanaz enziminin sıcaklık optimumunun ise 50 °C olduğunu saptamışlardır. Aygan (2008), *Bacillus* sp. C-14 suşundan izole edilen endoglukanaz enziminin optimum aktivitesini ise 50 °C'de gözlemiştir.

Bu literatür bilgilerine göre, izolasyonunu yaptığımız bakterilerce üretilen CMCaz enzimleri optimum sıcaklık değerleri bakımından yem sanayi için uygun görülmektedir. Bakterilerin üreme sıcaklık değerleri dikkate alındığında, *Bacillus* sp. VA1-29 suşunun üreme sıcaklığı termofil , *Bacillus* sp. VA1-30 suşu hiper termofil, *Bacillus* sp. VA1-49 hiper termofil ve *Bacillus* sp. VA1-45 ekstrem temofil suşu olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda izole edilen *Bacillus* sp. VA1-29 suşunun enzimin optimum aktivite gösterdiği pH 7.5-8 gibi bir pH aralığında aktiviteye sahip olduğu göstermiştir. Bu suşa ait optimum pH değeri ise 8 olarak belirlenmiştir. *Bacillus* sp. VA1- 30 suşu 7-9 pH aralığında yüksek aktivite gostermiş ve bu suş pH 8'de optimum aktiviteye sahibi olup ayrıca her iki enziminde moleküler ağırlığı aynıdır. Bu da muhtemelen her iki izolatan aynı bakteri olduğu savını güçlendirmektedir. *Bacillus* sp. VA1-49 suşundan izole edilen CMCaz enziminin 7.0-8.5 gibi geniş bir pH aralığında aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. *Bacillus* sp. VA1-49 suşuda pH 8'de optimum aktivite göstermiştir. *Bacillus* sp. VA1-45 suşundan izole edilen CMCaz enziminin 7.5-9.0 ve α -amilaz enziminin 7.5-10.0 gibi geniş bir pH aralıklarında aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. CMCaz enzimi pH 9.0'da ve α -amilaz enzimi pH 8.5'de optimum aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu suşa ait CMCaz enziminde pH 9-9.5'de %50 düşüş saptanmıştır.

Önceki çalışmalarla mukayese edildiğinde, Robson ve Chambliss (1984), *Bacillus* sp.'den üretilen selülaz enziminde aktivite analizi yapmışlar ve maksimum selülaz aktivitesin pH 4.8'de gerçekleştiğini bulmuşlardır. Hakamada ve ark (1997), alkalifilik *Bacillus* sp. KSM-S237'den izole edilmiş termostabil alkali selülazın optimum aktivitesini pH 8.6-9.0'da gösterdiği bildirmişlerdir. Bok ve ark. (1998), *Thermotoga neapolitana* bakterisinden enzimlerin optimum pH 6.0-6.6 ve 95 °C'de aktif olduklarını bulmuşlardır. Endo ve ark. (2001), *Bacillus* sp. KSM-N252

suşundan izole edilen endoglukanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH'nın 10.0 olduğunu belirlemişlerdir. Akita ve ark (2005), *Bacillus halodurans* C-125 suşundan izole edilen enzimin optimum aktivitesini pH 6 ve 8 de göstermiştir. Oyekola ve ark. (2007), izole ettikleri endoglukanaz enziminin pH optimumunun 6-6.5 olduğunu saptamışlardır. Biz yaptığımız çalışmada bütün CMCaz enzimi üreten suşların optimum gelişme pH'ları 7-10 aralığında bulunduğundan dolayı, mikroorganizmaların geliştirdikleri pH aralıklarına göre yapılan sınıflandırmaya göre alkalofiller grubunda yer aldıkları görülmektedir.

Literatürlerde selülaz (CMCaz) enzimlerinin büyük çoğunluğunda moleküler ağırlıkların 35 kDa ve 85 kDa arasında değiştiği bildirilmiştir (Mawadza ve ark.,2000; Hakamada ve ark., 2002; Singh ve ark., 2001; Endo ve ark., 2001; Kim ve ark., 2005; Voget ve ark., 2006; Zvereva ve ark, 2006; Zhang ve ark., 1983). Çalışmamızda CMCaz enzimi üreten izolatların çoğunluğunda moleküler ağırlıkların 32 kDa ve 40 kDa arasında değiştiği belirtilmiştir. Sadece *Bacillus* sp. VA1-45 suşuna ait moleküler ağırlığı 66 kDa saptanmıştır. CMCaz enzimi üreten izolatların spesifik aktivite analizi sonucu *Bacillus* sp. VA1-29, VA1-30 ve VA1-49 suşlarına ait değerler sırasıyla 0.6, 0.42 ve 0.41 olarak belirlenmiştir.

4.13.2. α -Amilaz

Çalışmada Hazar Denizin'den *Bacillus* sp. suşu izole edilen *Bacillus* sp. KH1-29 suşu tarafından üretilen α -amilaz enzimi bakteri gelişiminin 24-36. Saatleri arasında maksimum aktivite seviyesine ulaşmış, en yüksek seviyesini ise 36. Saatte göstermiştir. *Bacillus* sp. KH1-29 α -amilaz enziminin optimum aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değeri 90 °C olarak belirlenmiş, enzim 90°C sonra aktivitesini %90 oranında kaybetmiştir. *Bacillus* sp. KH1-29 α -amilaz enzimi pH 8'de optimum aktivite göstermiştir. İzole edilen α -amilaz enziminin 7-8 gibi bir pH aralığında aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. *Bacillus* sp. KH1-29 α -amilaz enziminin moleküler ağırlığının yaklaşık 45 kDa olduğu tahmin edilmiştir. Çalışmada izole edilen *Bacillus* sp. VA2-34 suşu bakteri gelişiminin 12-36 saatlar arasında yüksek α -amilaz aktivitesi gösterirken, en yüksek aktivite seviyesine 24. Saatte ulaşmıştır. *Bacillus* sp.

VA2-34 α -amilaz enziminin optimum aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değeri 90 °C olarak belirlenmiştir. izole edilen α -amilaz enziminin 7-8.5 gibi bir pH aralığında aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. *Bacillus* sp. VA2-34 α -amilaz enziminin optimum aktivite pH'sı 7.5 olduğu, moleküler ağırlığının ise yaklaşık 44 kDa olduğu tahmin edilmiştir. *Bacillus* sp. VA2-35 suşu bakteri gelişiminin 24-36 saatleri arasında yüksek α -amilaz aktivitesi gösterdiği, en yüksek seviye ise 36 saatte ulaştığı belirlenmiştir. Bu enziminin optimum aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değeri 50 °C, pH değerleri ise 6.5-9.5 (optimum 9) olarak bulunmuştur. Enzim pH 9.5'dan sonra yaklaşık %50 aktivitesini kaybetmiştir. *Bacillus* sp. VA1-41 α -amilaz enziminin moleküler ağırlığının yaklaşık 44 kDa olduğu tahmin edilmiştir. *Bacillus* sp. VA2-41 suşu α -amilaz enzimini bakteri gelişiminin 24-36. saatleri arasında yüksek düzeyde üretmiş, maksimum enzim üretime seviyesine ise 24. saatte ulaşmıştır. Enzim optimum aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değeri 40 °C, pH değeri ise 8 olarak belirlenmiştir. *Bacillus* sp. VA1-47 suşu iki enzim (α -amilaz ve CMCaz) üretmektedir ve her iki enzim de optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak hesaplanmıştır. Yapılan enzimatik analizler bu suşda α -amilaz enziminin ana aktivite, CMCaz enziminin ise yan aktivite olduğunu göstermiştir. α -Amilaz aktivitesi bakteri gelişiminin 24. saatinde, CMCaz aktivitesi ise 48. saatinde maksimum seviyeye ulaşmıştır. *Bacillus* sp. VA1-47 suşundan izole edilen CMCaz enziminin 7.5-9.0 ve α -amilaz enziminin ise 7.5-8.5 pH aralıklarında aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Her iki enzimin pH 7.0'de optimum aktivite göstermiştir. pH 6.5'den sonra α -amilaz enziminde %80 aktivite kaybı gözlenmiştir.

α -Amilaz ile ilgili yapılmış önceki çalışmalarda, Vihinen ve Mantsala (1990), *Bacillus stearothermophilus*'dan elde edilen α -amilazın aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın 50-70°C olduğunu, enzimin koruduğunu bildirmişlerdir. Lin ve ark (1998), enzim sentezinin 42-60°C sıcaklıkta, optimum 55°C de meydana geldiğini, *Bacillus* sp.TS-23 suşunun ise 55°C de ürediğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlarda amilaz üretimi ve bakteri üremesi için optimum sıcaklığın aynı olduğunu göstermişlerdir. Mamo ve ark (1999), Etiyopya'da sıcak su kaynaklarından izolasyonunu yaptıkları termofilik *Bacillus* sp.'den saflaştırdıkları amilaz enziminin optimum 75-80°C'de ve pH 5.0–8.0 arasında çalıştığını saptamışlar. Duedahl-Olesen ve ark (2000), *Bacillus*

clausii'den optimum pH 9.5 ve 55°C de aktivite gösteren, moleküler ağırlığı 101 kDa olan, nişastadan maltoheksoz oluşturabilen amilaz izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Hagihara ve ark (2001), 8.0-9.5pH ve 55-60°C'de aktivite gösteren molekül ağırlığı 55 kDa olan bir α -amilaz enzimi bildirmişlerdir. Deutch (2002), tuza karşı toleransı bulunan *Bacillus dipsosauri*'den ürettikleri amilazın optimum pH 6.5 ve 60°C aktivite gösterdiğini ve 1.0 mol L⁻¹ KCl konsantrasyonlarında da büyük bir aktivite toleransına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Amoozegar ve ark (2003), % 15 (w/v) tuz stres altında üretilen ekstrasellüler amilazın enziminin optimum aktivite sıcaklığının 50°C ve optimum pH aktivitesinin ise pH 7.5-9.0 arasında olduğunu rapor etmişlerdir. Konsula ve Liakopoulou-Kyriakidis, (2004). *Bacillus subtilis* α -amylase enziminin optimum 135°C aktivite gösterdiğini 160°C de ise %70 aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Das ve ark (2004), *Bacillus subtilis* suşundan, moleküler ağırlığı 42.8 kDa, optimum aktivite sıcaklığı 52-55°C ve pH'sı 9.0 olan, alkali alfa-amilaz izolasyonu yapmışlardır. Konsula ve ark (2004), mezofilik *Bacillus subtilis* suşundan izolasyonunu yaptıkları ekstrasellüler termostabil alfa-amilaz enziminde en yüksek aktivitenin 135°C ve pH 6.5'da gerçekleştiğini bulmuşlardır. Saxena ve ark (2007), izole ettikleri amilaz enziminin, maksimum aktivitesini pH 10.0 ve 90°C' gerçekleştirdiği ve enzimin 80-100°C arasında %100 stabil davranış gösterdiğini saptamışlardır. Asgher ve ark (2007), *Bacillus subtilis*'den izolasyonunu yaptıkları termostabil alfa-amilazın optimum aktivitesinin pH 8.0 ve 70°C olduğunu bulmuşlar. Aygan (2008), optimum aktivite sıcaklığı 150 °C ve optimum pH'sı 10.5 olan amilaz enzimi üreten *Bacillus* sp. AB-17 suşunu izole etmişlerdir.

Bu literatür bildirişleri gözönünde bulundurduğunda, Konsula ve Liakopoulou-Kyriakidis, (2004) tarafından bildirilen α -amilazlar dışında diğer α -amilaz enzimlerinin bizim izole ettiğimiz bakterilere ait α -amilaz enzimleri ile benzer optimum sıcaklık aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. Hatta KH1-29 ve VA2-34 izolatları tarafından üretilen α -amilaz enzimleri en iyi 90°C'de aktivite göstermektedir ve bu değer diğer araştırmacılar tarafından bildirilen optimum sıcaklık değerlerinden yüksektir. *Bacillus* sp. KH1-29 ve VA-34 suşları en iyi 55°C'de geliştikleri halde ürettikleri α -amilaz enzimleri 90°C'de aktivite göstermektedirler.

Bakteriler termofil veya termotolerant bir özellik gösterirken enzimler yüksek bir termostabilite özellik göstermektedirler.

Optimum pH'ları incelediğimizde *Bacillus* sp. KH1-29 ve VA2-41 enzimi pH 8'de (alkalofil), *Bacillus* sp. VA2-34 enzimi pH 7.5'de (alkalofil), *Bacillus* sp. VA2-35 enzimi pH 9'da (alkalofil) ve VA1-47 pH 7.0'de (nötrofil) optimum aktivite göstermiştir. Aynı şekilde literatürdeki çalışmalara baktığımızda optimum pH aktiviteleri 2 sınıf (alkalofil - nötrofil) içinde yer almaktadırlar. α -Amilaz enzimi üreten suşlar arasında *Bacillus* sp. VA2-35, 3.21 değeri ile diğer suşlara göre maksimum spesifik aktivitesi belirlenmiştir. *Bacillus* sp. VA2-34 , KH1-29 ve VA2-41 suşlarına ait spesifik aktivite sırasıyla 0.46 , 0.63 ve 1.57 olarak belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. İzole ettiğimiz *Bacillus* sp. suşları tarafından enzimlerin zamana göre aktivitelerini incelendiğinde, VA1-29 (CMCaz enzimi üreten) ve VA1-49 (CMCaz enzimi üreten) bakterinin üreme periyodunun 12. saatinde maksimum düzeyde çıkmıştır. Bu iki suş diğer suşlara göre minimum bir aktivite göstermiştir. Ayrıca VA1-47 (CMCaz ve α -amilaz enzimlerin üreten) ve VA1-45 (CMCaz ve α -amilaz enzimlerin üreten) suşlarda diğer suşlar arasında 48 saat olarak maksimum aktivite göstermişlerdir
2. Çalışmada izole ettiğimiz *Bacillus* sp. suşlar arasında VA2-34 (α -amilaz enzimi üreten) ve KH1-29 (α -amilaz enzimi üreten) en yüksek optimum sıcaklık aktivitesi göstermişlerdir. Optimum sıcaklık aktivitesi her iki suş için 90°C olarak belirlenmiştir. 2. sırada VA1-49 (CMCaz enzimi üreten) 80°C olarak belirlenmiştir. Minimum aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değeri VA2-41 (α -amilaz enzimi üreten) suşa ait 40°C olarak belirlenmiştir. En yüksek optimum sıcaklık aktivitesi gösteren suşlar α -amilaz üreten bakteriler olduğu belirlenmiştir.
3. *Bacillus* sp. suşlarının optimum pH aralıkları incelendiğinde, VA1-45 ve VA2-35 maksimum aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. VA1-45 CMCaz enzimini pH 9'da, α -amilaz enzimi pH 8.5'te ve VA2-35 suşu pH 9'da α -amilaz enzimi üreterek, çalıştığımız suşlar arasında maksimum aktivite göstermişlerdir.
4. İzole edilen *Bacillus* sp. suşlarının farklı enzim aktivitelerinin karşılaştırılması sonucunda *Bacillus* sp. VA1-45 suşu iki farklı enzim ürettiği saptanmıştır. Bu suş %100 CMCaz enzimi ürettiği zaman α -amilaz enzimine ait aktivite %89 olduğu belirlenmiştir. *Bacillus* sp. VA1-47 suşunda ise α -amilaz enziminin üretimi %100 olduğu zaman CMCaz enzim aktivitesi %53 olduğu belirlenmiştir.
5. Çalışmadaki *Bacillus* sp. suşlarının spesifik aktivite analizinde maksimum spesifik aktivite VA2-35 ve VA2-41 suşuna ait olmuştur. *Bacillus* sp. VA2-35 suşu 3.21 mmol/dk/mg protein spesifik aktivite gösterirken ürettiği

belirlenmiştir. *Bacillus sp.* VA2-41, *Bacillus sp.* VA2-35'den sonra 1.57 mmol/dk/mg protein spesifik aktiviteye sahip olmuştur.

6. İzole edilen *Bacillus sp.* suşlarının SDS-PAGE ve zymogram analizi sonucunda *Bacillus sp.* VA2-35 suşu moleküler ağırlığı yaklaşık 60 kDa olarak diğer α -amilaz üreten suşlara göre üstünlük göstermiştir. CMCaz üreten suşlarda ise *Bacillus sp.* VA1-45 SDS-CMC-PAGE'de moleküler ağırlığı yaklaşık 66 kDa olarak diğer CMCaz üreten suşlara göre üstünlük göstermiştir.

İzole edilerek karakterize edilen bakteri suşlarına ait enzimatik analiz sonuçları özetle Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Suşlara ait bütün enzimatik analizler sonucu

Suş	Analiz	Enzim	Zamana göre enzim aktivitesi	Sıcaklık°C		pH		Moleküler ağırlık (kDa)	Spesifik aktivite (mmol/dk/mg protein)
				Aralık	Optimum	Aralık	Optimum		
VA1-29		CMCaz	12. saatinde	-	50°C	7.5-8	8	33	0.6
VA1-30		CMCaz	24. saatinde	-	60°C	7-9	8	32	0.42
VA1-49		CMCaz	12. saatinde	50-90°C	80°C	6.5-8.5	8	40	0.41
VA1-47		CMCaz	48. saatinde	30-50°C	50°C	7.5-9	7.5	32	0.31
		α -Amilaz	24. saatinde	40-70°C	50°C	7.5-8.5	7.5	45	0.5
VA1-45		CMCaz	48. saatinde	-	90°C	7.5-9	9	66	1.1
		α -Amilaz	24. saatinde	90-100°C	90°C	7.5-10	8.5	45	0.4
VA2-34		α -Amilaz	24. saatinde	-	90°C	7-8.5	7.5	44	0.46
VA2-35		α -Amilaz	36. saatinde	-	50°C	6.5-9	9	60	3.21
VA2-41		α -Amilaz	24. saatinde	40-50°C	40°C	7.5-8.5	8	44	1.57
KH1-29		α -Amilaz	36. saatinde	80-90°C	90°C	7-8	8	45	0.63

Sonuç olarak, izolasyonlarını yaptığımız suşların ve endüstriyel önemlere sahip enzimlerinin karakterizasyonuna ait verilere göre aşağıdaki çalışmaların yapılması önerilebilir:

1. Nişasta işletmelerinde en fazla istenilen durum jelatinleştirme ve sıvılaştırma çalışmalarında çok yüksek sıcaklıklarda aktivite gösteren α -amilaz enziminin bulunması ve kullanılmasıdır. İlk aşama olan jelatinleştirme 140-150°C sıcaklıklarda 5 dakika süreyle gerçekleştirilir ve 100-105°C'ye kadar soğutulur. Bu aşamada α -amilaz enzimi ilave edilerek nişastanın sıvılaştırılması sağlanır. Optimum aktivitesini 90 °C de gösteren *Bacillus sp.* VA2-34 ve *Bacillus sp.* KH1-29 α -amilaz enzimi nişastanın hidrolizi çalışmalarında kullanıldığında yüksek düzeyde verim sağlanması mümkündür.
2. Tekstil endüstrisinde haşılama işlemlerinde de çok fazla miktarlarda nişasta kullanılmaktadır. Tekstil endüstrisinde kullanılan iplik, dokuma işlemi sırasında eğilebilir. İpliğin daha dayanıklı ve sağlam olması gerekmektedir. Bunun için çok sıcak nişasta kullanılır. Nişasta, ipliği sağlamlaştırarak çok sağlam hale getirir. Böylece dokuma sırasındaki uygunsuz koşullar ve stres altında iplik, dayanıklılığını korur. Nişasta tekstilde dokuma, kaplama ve yağlama sırasında kırılmaları ve eğilmeleri önler. Tekstil endüstrisi pH'sı yaklaşık 12 ve sıcaklığı en az 80 °C olan işletmelerdir. Haşılama işlemlerinden sonra kumaşlardan nişastanın uzaklaştırılmasında son yıllarda enzim kullanımı önemli bir yer tutmaktadır. *Bacillus sp.* KH1-29 α -amilaz enziminin Optimum aktivitesini 90 °C ve pH 8'de gösteren özelliği tekstil endüstrisindeki işletmeler için ideal bir enzim olacağı düşünülmektedir .
3. Amilaz enzimlerinin en fazla kullanıldığı alanlardan bir diğeri deterjan endüstrisidir. Özellikle alkalin, termostabil, halofil, SDS, triton X-100 ve β -merkaptoetanol gibi deterjan ve yüzey aktif ajanlara dirençli özellik gösteren enzimler, deterjan formülasyonunda öncelikli bir yere sahiptir. Bu açıdan *Bacillus sp.* KH1-29 amilaz enzimi, ideal endüstriyel enzim özelliğindedir.
4. Son yıllarda selüloz kullanımı özellikle tekstil, temizlik, kağıt, içecek ve şarap endüstrisinde önemli düzeyde artış göstermiştir. Ayrıca hayvan yemlerinin üretimi, tekstil ve temizlik endüstrisi, kağıt hamuru hazırlama işletmeleri ile

tarımsal uygulamalar selülaz kullanım alanları arasındadır. İzolasyonunu gerçekleştirdiğimiz *Bacillus sp.* VA1-49 CMCaz enziminin optimum aktivitesinin pH 8.0 gerçekleşmesi, optimum aktivite sıcaklığının 80°C’de olması, enzimin tekstil uygulamaları, kağıt endüstrisi, hayvan yemi hazırlanması gibi uygulamalarda kullanılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

- AEHLE, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-Vch Verlag, Weinheim, 484 s.
- AIBA, S., KILAL, K., and IMANAKA, T., 1983. Cloning and expression of thermostable α -amilase gene from *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*. Appl. And Environm. Microbiol. 46 (5):1059-1065.
- AIYER, P.V., 2005. Amylases and their applications. African Journal of Biotechnology, 4: 1525-1529.
- 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., KOCABAĞLI, N., ABAŞ, İ. ve AKSU, H., 1999. Bugday ve Arpa Ağırlıklı Rasyona Katılan Farklı Enzim Karmalarının Broyler Performansına ve İleum pH'sına Etkisi, Tr. J. of Vet. Anim. Sci., 23 (Ek sayı 3): 617-622.
- AMOOZEGAR, M.A., MALEKZADEH, F. and MALIK, K.A., 2003. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. Strain MA-2. Journal of Microbiological Methods, 52: 353-359.
- ANONYMOUS, 2012a. <http://www.bilgi.aof.edu.tr/ekitap/biy104u.pdf>
- ANONYMOUS, 2012b. <http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook/index.html>
- ARİKAN, B., ÜNALDI, N., CORAL, G., COLAK, O., AYGAN, A. and GÜLNAZ, O. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. Process Biochemistry, 38:1397-1403.

- 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.
- AYGAN, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selüloz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Ç.Ü. F. B. E. Doktora Tezi.
- AYHAN, K., 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, 43-44. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.
- BAJPAI, P. and BAJPAI, K.P., 1987. High temperature alkaline α -amylase from *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. Biotechnology and Bioengineering, 33:72-78.
- BERNHARDSDOTTER, E.C.M.J., NG, J.D., GARRIOTT, O.K. and PUSEY, M.L., 2005. Enzymic properties of an alkaline chelator-resistant α -amylase from alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate L1711. Process Biochem., 40:2401-2408.
- BERTOLDO, C. and ANTRANIKIAN, G., 2002. Starch hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology, 6:151-160.
- BHAT, M. K., 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances, 18(5): 355-383.
- BİLGEHAN, H., 1995. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Şafak Matbaacılık. İzmir. 768p.
- 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*. Appl. Environ. Microbiol, 64: 4774-4781.
- BROCK, T.D., BROCK, K.M., BELLY, R.T. and WEISS, R.L. 1972. Sulfolobus: A New Genus Of Sulfur-Oxidizing Bacteria Living At Low Ph And High Temperature. Arch. Microbiol. 84: 54-68.
- BOLLAG, D.M., ROZYCKI, M.D. and EDELSTEIN, S.J., 1996. Protein Methods (2nd Edt). Viley-Liss Press, USA. 414s.

- BONNEAU, M. and LAARVELD, B., 1999. Biotechnology in Animal Nutrition, Physiology and Health Livestock Production Science, 59 (1999) 223–241.
- BROCK, T. D., 1986. Thermophilic Microorganisms And Life At High Temperatures New York: Springer Verlag, 1986 Xi, 465 P.: Ill. ; 25 Cm.
- BURG, B., 2003. Extremophiles as a Source for Novel Enzymes. Current Opinion in Microbiology, 6: 213-218.
- CAMPBELL, L.L., Jr., 1952. Physiological studies on thermophilic bacteria. Ph.D. Thesis, University of Texas, Austin, Teksas.
- CANOĞULLARI, S., 1999. Etlik Piliç Karma Yemlerinde Enzim Kullanımı ve Kullanım Koşulları. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Adana.
- CEYLAN, N., SARICA, S. ve GÜRSOY, Ü., 1999. Kanatlı Yemlerinde Fitin Fosfor Yarıyışlılığını Artırmaya Yönelik Uygulamalar, S.321-329. Poultry Yutav'99 Uluslar Arası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı 3-6 Haziran Bildiriler Kitabı, İstanbul.
- 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.
- CORAL, G., ARIKAN, B., ÜNALDI, M.N. and GÜVENMEZ KORKMAZ, H. 2002. Some properties of thermostable xylanase from an *Aspergillus niger* strain. Ann. Microbiol. 52:299-306.
- COŞKUN, B., ŞEKER, E. ve ÜNAL, F., 2000. Yemler ve Teknolojisi, 3. Baskı, S.Ü. Vet. Fak. Yay., Konya.
- 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. Biotechnol. Appl. Biochem, 40:291-298.
- DEMİREL, R. ve GÜRBÜZ, Y., 1999. Karma Yemlerde Enzim Kullanımı. Poultry'99 Uluslararası Tavukçuluk Fuarı Ve Konferansı 3-6 Haziran Bildiriler Kitabı. İstanbul, 489-495.

- DEMIRJIAN, D.C., FRANCISCO, M.V. and CONSTANCE, S.C. 2001. Enzymes from Extremophiles. *Current Opinion In Chemical Biology*, 5: 144-151.
- DE ROSA, M., MORANA, A., RICCIO, A., GAMBACORTA, A., TRINCONE, A. and INCANI O., 1994. Lipids of The Archaea: A New Tool For Bioelectronics. *Biosens. Bioelectr*, 9, 669–675.
- DEUTCH, C.E., 2002. Characterization of a salt-tolerant extracellular α -amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 78–84.
- DİLER, A., 2007. Probiyotik + Enzim Kombinasyonunun Esmer Irkı Buzağılarda Yemden Yararlanma Ve Büyüme Performansı Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üni Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Programı. Erzurum.
- 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.
- DURAN, K., KORKMAZ, A., 1999. Ön Terbiyede Enzim Kullanımı. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 9(4): 320-326.
- DYALL-SMITH, M., 2008. The Halo handbook- Protocols for Haloarchaeal Genetics, Version 7.0.
- ENDO, K., HAKAMADA, Y., TAKIZAWA, S. and KUBOTA, H., 2001. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 109-116.
- ERKEK, R., TALUĞ, A.M., KIRKPINAR, F. ve SEVGİCAN, F., 1996. Hayvan Beslemede Gelişmeyi Teşvik Edici Madde Kullanımı ve Sorunları. Uluslararası Hayvancılık'96 Kongresi, 18-20 Eylül. 463-470, İzmir.
- ERGÜN, A., 2001. Tavukların Beslenmesi, S.265-303. Ed. ERGÜN, A., TUNCER S.D., Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları, Medipres, Ankara.
- FUJIWARA, S., 2002. Extremophiles: Developments of Their Special Functions and Potential Resources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 518-525.

- GODFREY, T. and WEST, S., 1996. Introduction to Industrial Enzymology. Industrial Enzymology, (Second Edition). Ed. by T. Godfrey and S. West. Stockton Press, New York.
- GOMES, J. and STEINER, W., 2004. Extremophiles and extremozymes. Food Technol. Biotechnol, 42 (4) 223–235.
- GRIGOREVSKI DE LIMA, A.L., PIRES DO NASCIMENTO, R. and PINTO DA SILVABON, E., COELHO, R.R., 2005. *Streptomyces drowizii* Cellulase production using Argo-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries, enzyme and microbial technology, 272-277p.
- GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V.K. and CHAUHAN, B., 2003. Microbial α -Amylases: A Biotechnological Perspective. Process Biochemistry, 38: 1599-1616.
- HAGIHARA, H., IGARASHI, K., HAYASHI, Y., ENDO, K., IKAWA-ITAYAMA, K., OZAKI, K. and KAWAI, S., ITO, S., 2001. Novel α -Amylase That Is Highly Resistant to Chelating Reagents and Chemical Oxidants from the Alkaliphilic *Bacillus* Isolate KSM-K38. Appl. and Env. Microbiol, 67:1744-1750.
- HAKAMADA, Y., KOIKE, K., YOSHIMATSU, T., MORI, H., KOBAYASHI, T. and ITO, S., 1997. Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus sp.* KSM-S237. Extremophiles, 1:151-156.
- HAKAMADA, Y., ENDO, K., TAKIZAWA, S., KOBAYASHI, T., SHIRAI, T. and YAMANE, T., ITO, S., 2002. Enzymatic properties, crystallization and deduced amino acid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. Biochimica et Biophysica Acta, 1570: 174-180.
- HERBERT, R. and SHARP, R., 1992. Molecular Biology and Biotechnology of Ekstremophiles. Chapman and Hall, NY.
- HIRASAWA, K., UCHIMURA, K., KASHIWA, M., GRANT, W.D., ITO, S. and KOBAYASHI, T., HORIKOSHI, K. 2006. Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. Antonie van Leeuwenhoek, 89:211-219.

- HOLS, P., FERAIN, T., GARMYN, D., BERNARD, N. and DELCOUR, J., 1994. Use of expression secretion signals and vector free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus plantarum* for α -amilase and levanase expression. Appl. And Environm. Microbiol, 60 (5): 1401-1403.
- HORIKOSHI K. and GRANT, W.D., 1998. Ekstremophiles, Chapter 4 Halophiles (W.D. Grant, R.T. Gemmel, T.J. Mcgennity), Wiley-Sons Inc.New York, 93-133.
- HORIKOSHI, K., 1999. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev, 63:735-750.
- HREGGVIDSSON, G.O., KAISTE, E., HOLST, O., EGGERTSSON, G., PALSDOTTIR, A. and KRISTJANSSON, J.K., 1996. An Extremely Thermostable Cellulase from the Thermophilic Eubacterium *Rhodothermus marinus*. Appl. Environ. Microbiol,62: 3047-3049.
- HUANG, X.P. and MONK, C., 2004. Purification and characterization of a cellulose (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovarans* gen. nov., sp. nov. World J. Microbiol. Biotechnol, 20: 85-92.
- HUTCHEON, G.W., VASIST, N. and BOLHUIS, A.,2005. Characterization of a highly stable α -amylase from the halophilic archeon *haloarcula hispanica*. Extremophiles,9:487-495.
- JOHN, W. and SONS, I., 1998. Industrial Enzymes and Their Applications. United States of Amerika. 454p.
- KALAYCIOĞLU, L., SERPEK, B., NİZAMOĞLU, M., BASPINAR, N. ve TİFTİK A.M., 2000, Biyokimya, Nobel Yayın Dağıtım, 163-165, 246-247.
- 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, A., AKGÜL, M. ve TUTUŞ, A., 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1). Ksü Fen ve Mühendislik Dergisi 5(1).

- KARADEMİR, G. ve KARADEMİR, B., 2003. Yem katkı maddesi olarak kullanılan biyoteknolojik ürünler. *Lalahan.Hay.Araşt.Enst.Derg*, 43(1): 61- 74.
- KIM, J-Y., HUR, S-H. and HONG, J-H., 2005. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus sp.* HSH-810. *Biotechnol. Lett*, 27:313-316.
- 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. *Appl.Environ. Microbiol*, 61:3105-3112.
- 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. *Animal Science Journal*, 73: 215-220.
- KONSULA, Z. and LIAKOPOULOU-KYRAIDES, M., 2004. Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochem*, 39:1745-1749.
- 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.
- KUMAR, S. and NUSSINOV, R. 2001. How Do Thermophilic Proteins Deal with Heat? *Cell Mol. Life Sci*, (58) 1216-1233.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LEE, S-P., MORIKAWA, M., TAKAGI, M. and IMANAKA, T., 1994. Cloning of the *aapT* Gene and Characterization of Its product, α -Amylase-Pullulanase (AapT), from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus sp.* Strain XAL601. *Appl.Environ.Microbiol*, 60:3764-3773.
- LENNETE, E.H., BALLOWS, A., HAUSLER, J.W.Jr. and SHADOMY, J.H., 1985. *Manuel of Clinical Microbiology*, Vol 4.USA.1149s.

- LIN, L.L., CHYAU, C.C. and HSU, W.H., 1998. Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28:61-68.
- LOPEZ, G., 1999. DNA Supercoiling and Temperature Adaptation: A Clue to Early Diversification of Life. *J. Mol. Evol.* 46, 439–452.
- LOWE, S.E., JAIN, M.K. and ZEIKUS, J.G., 1993. Biology, Ecology, and Biotechnological Applications of Anaerobic Bacteria Adapted To Environmental Stresses in Temperature, pH, Salinity or Substrates. *Microbiol Rev.* Jun, 57(2):451–509.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-271.
- LYND, L.R., WEIMER, P.J., VAN-ZYL, W. H. and PRETORIUS, I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 506–577.
- MADERN, D. and EBEL, C., 2000. Halophilic Adaptation of Enzymes Extremophiles 4:91-98.
- MADIGAN, M.T. and MARRS, B.L. 1997. Extremophiles. *Sci. Am.* (276) 66–71.
- MAMO, G., GASHE, B.A. and GESSESSE, A., 1999. A highly thermostable from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. WN11. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 557-560.
- 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. *J. Biotechnol.* 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.

- MORGAN, F.J. and PRIEST, F.G., 1981. Characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. J.Appl. Bacteriol., 50: 107-114.
- NELSON, D.L. and COX, M.M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry, Chapter 6. W. H. Freeman, Fourth Edition.
- 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.
- NOUSIAINEN P. ve BUCHERT J., 2004. Tekstil ve Lif İşlemlerinde Kullanılan Biyoteknolojideki Son Gelişmeler, X. Ulus-lararası İzmir Tekstil ve Hazır Giyim Sempozyumu, Meta Basım, İzmir, s:128-139.
- NIEHAUS, F., BERTOLDO, C., KAHLER, M. and ANTRANIKIAN, G., 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Appl. Microbiol. Biotechnol, 51:711–29.
- OREN, A., 2002. Cellular Origin and Life in Extreme Habitats-Halophilic Microorganisms and Their Environments. Joseph Sechbach (Ed), Kluwer Academic Publishers, Volume 5: 357-375, Jerusalem.
- OYEKOLA, O.O., NGESI, N. and WHITELEY, C.G. 2007. Isolation, purification and characterisation of an endoglucanase and β -glucosidase from an anaerobic sulphidogenic bioreactor. Enzyme and Microbial Technology, 40: 637-644.
- ÖZÇELİK, S., 1995. Genel Mikrobiyoloji, Isparta, 1-33.
- ÖZEN, N., 2007. Hayvan Besleme. [http:// www.zmo.org.tr / etkinlikler / 6tk05 / 037 nihatozen. pdf](http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/037nihatozen.pdf) (30.04.2007).
- POLAINA, J. and MACCABE, A.P., 2007. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Springer. The Netherlands.
- ROBSON, L.M. and CHAMBLISS, G.H., 1984. Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. Appl. Environ. Microbiol, 47:1039-1046.
- ROTHSCHILD, L. J. and MANCINELLI, R. L., 2001. Life in extreme environments, Nature, (409):1092–1101.
- ROSOVITZ, M.J., VOSKUIL, M.I. and CHAMBLISS, G.H., 1998. Bacillus, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic

- Bacteriology, and Edition, Volume 2, By Edited Collier L., Balows, A. And Susman, M., Oxford University Pres, New York, 709-730.
- SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- SAXENA, R.K., DUTT, K., AGARWAL, L. and NAYYAR, P., 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp.PN5. Bioresource Tech., 98:260-265.
- SELLEK, G.A. and CHAUDHURI, J.B., 1999. Biocatalysis in Organic Media Using Enzymes From Extremophiles. Enzyme Microb Technol, 25: 471-482.
- SEVGİLİ, H. ve ÖZEN, N., 1999. Arpa-Buğday Ağırlıklı Bildircin Karma Yemlerinde Enzim Kullanımının Performansa Etkileri. Poultry'99 Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı 3-6 Haziran Bildiriler Kitabı. İstanbul, 617-625.
- SIDHU, G. S., SHARMA, P., CHAKRABARTI, T. and GUPTA, J.K., 1997. Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. Enzyme. Microb. Technol., 21:525-530.
- SINGH, J., BATRA, N. and SOBTI, R.C., 2001. A highly thermostable, alkaline CMCase produced by a newly isolated *Bacillus* sp.VG1. World J. Microbiol. Biotechnol., 17: 761-765.
- SINGH, J., BATRA, N. and SOBTI, R.C., 2004. Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 31: 51-56.
- SMITH, A.M., 2001. The Biosynthesis of Starch Granules, Biomacromolecules, 2: 335-341.
- SNEATH, P.H.A., 1986. Endospore-Forming Gram-Positive Rods and Cocci, Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Volume 2, Edited By Pha Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe, J.G., Williams and Wilkins, Holt, 1104-1139.
- TEMİZKAN, G. ve ARDA, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, İst. 345s.

- VIEILLE, C. and ZEIKUS, J.G. 1996. Thermozyms; Identifying Molecular Determinants of Protein Structural and Functional Stability. Tibtech June, 14; 183-190.
- VIHINEN, M. and MANTSALA, P., 1990. Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus* α -amylase. Biotechnol. Appl. Biochem.,12:427-435.
- VOGET, S., STEELE, H.L. and STREIT, W.R., 2006. Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. J Biotechnol, 126:26-36.
- WIPAT, A. and HARWOOD, C., 1999. The *Bacillus Subtilis* Genome Sequence: The Molecular Blueprint of a Soil Bacterium. Fems Microbiology Ecology, 28: 1-9.
- WISEMAN, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, P. 274-373.
- WOLFGANG, A. 2004. Enzymes in industry: Production and applications. Wileyvch Verlag GmbH&Co. KgaA, Weinheim.
- YALÇIN, S., ÇİFTÇİ, İ., ÖNAL, A.G. ve YILMAZ, A., 1996. Yem Katkı Maddelerinde Gelişmeler. 3. Uluslararası Yem Kongresi ve Yem Sergisi, Antalya.
- YERNOOL, J-D.B.D. and EVELEIGH, D.E., 1998. Purification, characterization and molecular analysis of thermostable cellulase CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. Appl.Environ.Microbiol,64:4774-4781.
- ZEIKUS, J.G. and WOLFE, R.S., 1972. *Methanobacterium thermoautotrophicum* Sp. Nov., An Anaerobic, Autotrophic, Extrem Thermophile. J. Bacteriol. 109: 707-713.
- ZHANG, Q., TSUKAGOSHI, N., MIYASHIRO, S. and UDAKA, S., 1983. Increased production of α -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of glycine. Applied and Environmental Microbiology,46: 293-295.

- ZİYAN, E., 1998. Polifenol Oksidaz Enziminin Ankara Armudu (*Pyrus Communis*)’dan İzole Edilmesi, Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Y.Lisans Tezi; Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.
- ZVEREVA, E. A., FEDOROVA, T. V., KEVBRIN, V. V., ZHILINA, T. N. and RABINOVICH, M. L., 2006. Cellulase activity of a haloalkaliphilic anaerobic bacterium, strain Z-7026. *Extremophiles*, 10: 53-60.

ÖZGEÇMİŞ

İran uyruklu, 09/01/1983 yılında Naghadeh’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Naghadeh’de tamamladıktan sonra 2008 yılında İran Azade Shabestar Üniversitesi Zootečni Bölümün’den mezun oldu. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootečni Anabilim Dalın’da yüksek lisans eğitimine başladı.

EKLER

EK-1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

1.1. LB Agar

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

Bileşimi	g/L
Trypton	10
Maya Ekstraktı	5
NaCl	10
Agar	15

İstenen özellikteki bakteri izolasyonu için NaCl miktarı veya pH olarak modifiye edilmiştir.

1.2. LB-CMC-Agar Besiyeri

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

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

1.3. LB-Ksilan-Agar Besiyeri

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

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Tripton	10
Maya Ekstraktı	5
NaCl	240
Agar	15
Ksilan	1

1.4. LB-Nişasta-Agar Besiyeri

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

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Tripton	10
Maya Ekstraktı	5
NaCl	10
Agar	15
Nişasta	5

1.5. LB-Likenan-Agar Besiyeri

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

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Tripton	10
Maya Ekstraktı	5

NaCl	10
Agar	15
Likenan	1

1.6. Kazein-Agar Besiyeri:

Bakterilerin kazeinaz aktivitelerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır (Bilgehan, 1995).

Bileşimi	g/L
Pepton	5
Maya	3
Süt Tozu	1
Agar	12
Distile su	1000 ml

1.7. LB-İnülin-Agar Besiyeri

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

Bileşimi	g/L
Tripton	10
Maya Ekstraktı	5
NaCl	10
Agar	15
İnülin	1

EK-2.ÇÖZELTİLER

2.1. NaOH Çözeltisi

Besiyerlerinin pH'sını ayarlamak amacı ile 2 N NaOH çözeltisi kullanılmıştır (Aiba ve ark., 1983).

2.2. İyodin Boyası (100 ml)

Katı besiyerindeki amilaz enzim aktivitesini ve SDS-PAGE jel uygulamasında jeldeki amilaz aktivitesinin gösterilmesi için kullanılır. 100 ml iyodin boyası hazırlamak için 50 ml metanol, 10 gr potasyum iyodid ve 1 gr iyodin (iyot) bir erlenin içerisine konur. Bir miktar saf su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda iyice çözdürülür. Hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2.3. Kongo Kırmızısı (Congo red) (%0.1 w/v)

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

2.4. NaCl Çözeltisi (1 M)

Petri kabında selüloz 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. Sodyum-Fosfat Tamponu

Enzimlerin pH 5.5-8 arasındaki aktivitelerini saptamak amacı ile kullanılmıştır. 0.2 M solusyon A (27.8 gr NaH_2PO_4 /1000 ml) ve 0.2 M solusyon B $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (53.65 gr/1000 ml) stok çözeltileri hazırlanır ve istenilen pH değerleri için uygun karışımların elde edilmesi amacıyla kullanılır (Temizkan ve Arda, 2004).

2.6. Tris Tamponu

Enzimlerin pH 7.5-12 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).

2.7. Dinitro Salisilik Asit (DNS)

Enzim aktivitesini durdurmak ve indirgen şeker miktarının saptanması amacı ile kullanılmıştır. 1 g DNS (50 mL de-iyonize su içinde çözüldükten sonra), 30 g K-Na-Tartarat ve 20 mL 2N NaOH ilave edilerek, son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır (Aiba ve ark.,1983).

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

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

2.9. 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 °C'de 15 dk otoklav yapılarak +4 °C'de saklanır.

2.10. 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.

2.11. 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.

2.12. %10 w/v SDS

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

2.13. Akrilamid Solüsyonu

<u>Bileşimi</u>	<u>g</u>
Akrilamid	29.2
Bisakrilamid	0.8
Distile su	100 mL

Yukardaki bileşikler bir miktar distile su içerisinde çözüldükten sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır (Bollag ve ark., 1996).

2.14. Amonyum Persülfat (AMPS) %10

0.5g AMPS 5mL distile su içerisinde çözülerek hazırlanır (Bollag ve ark, 1996).

2.15. 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.

2.16. Örnek Yükleme Tamponu (Bollag ve ark, 1996).

Bileşimi	mL
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.6
Gliserol %50	5
β-Merkaptoetanol	0.5
Bromfenol mavisi	%1 1
SDS % 10 w/v	2
Distile su	0.9 (Bollag ve ark, 1996).

2.17. Coomasie Brilliant Blue Boyası (CBB) Stok Solüsyonu (1 L)

SDS-PAGE jellerinin elektroforezden sonra boyanması ve protein bantlarının görünür hale gelmesi amacı ile kullanılmıştır.

Bileşimi

Coomassie blue (% 0.2 w/v)	2 gr
Metanol (% 50 v/v)	500 ml
Glasial asetik asit (% 10 v/v)	100 ml
Saf su	400 ml

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

2.18. Jel Boyama (Staining) Solüsyonu**Bileşimi**

Comassie Brilliant Blue R-250	1 g
Metanol	450 mL
Glasial Asetik Asit	100 mL
Distile su	450 mL

1g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 mL metanol içerisinde çözülüp filter kağıdından süzildükten sonra, karışımın üzerine 100 mL glasial asetik asit ve 450 mL distile su eklenerek hazırlanır (Bollag ve ark, 1996).

2.19. Jelden Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu (Bollag ve ark, 1996).

<u>Bileşimi</u>	<u>mL</u>
Metanol	100
Glasial Asetik Asit	100
Distile su	800

2.20. Hücre dışı Proteinlerin TCA Muamelesi İle Elde Edilmesi

1. Bakteri kültürü steril öze yardımıyla 25 ml hacimli LB sıvı besiyerine ekilerek 55 °C’de 48 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 olacak şekilde 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.