ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

YENİ TÜRLER OLDUKLARI ÖNGÖRÜLEN AMİLAZ ÜRETİCİSİ TERMOFİLİK *ANOXYBACILLUS* İZOLATLARININ FENOTİPİK, KEMOTAKSONOMİK VE MOLEKÜLER TAKSONOMİK YAKLAŞIMLAR KULLANILARAK TEŞHİSİ

Emine Derebay Yıldız

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Arzu Çöleri Cihan

Kasım

2017

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Emine Derebay Yıldız

İmzası

i

ONAY

Doç. Dr. Arzu Çöleri Cihan danışmanlığında Emine Derebay Yıldız tarafından hazırlanan bu çalışma 21/11/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ	İmza:
Üye: Prof. Dr. Birgül ÖZCAN	İmza:
Üye: Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ	İmza:
Üye: Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN	İmza:
Üye: Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN	İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Yeni Türler Oldukları Öngörülen Amilaz Üreticisi Termofilik *Anoxybacillus* İzolatlarının Fenotipik, Kemotaksonomik ve Moleküler Taksonomik Yaklaşımlar Kullanılarak Teşhisi

Emine Derebay Yıldız

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Arzu Çöleri Cihan

Anoxybacillus sp. E184aa ve E208a izolatlarının tür teşhisi çalışmaları neticesinde termofilik, Gram (+), fakültatif anaerobik, endosporlu, hareketli ve yüksek kantitatif amilolitik aktiviteye sahip basiller oldukları belirlenmiştir. 16S rRNA gen dizilerine dayalı filogenetik analizler, izolatların en çok birbirlerine (% 99.4) ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*, *A. salavatliensis*, *A. kamchatkensis*, *A. ayderensis* ve *A. gonensis* (% 97.9-98.7) referans suşlarına benzediklerini göstermiştir. E184aa (55°C, pH 7.5, % 1.0-1.5 NaCl) ve E208a (55°C, pH 7.0, % 0.5-1.0 NaCl) izolatlarının optimum üreme parametreleri belirlenmiştir. Hücre zarlarındaki temel melakinonun MK-7, yağ asitlerinin iso-$C_{15:0}$ ve iso-$C_{17:0}$ ve hücre duvarlarındaki tanılayıcı diamino asitin *meso*-Dpm olduğu belirlenmiştir. E184aa ve E208a izolatlarının genomik DNA G+C içerikleri sırasıyla 41.9 ile 42.2 % mol'dür. Morfolojik, fizyolojik ve kemotaksonomik testler, *Hae*III-ARDRA, ITS-PCR, $(GTG)_5$-PCR ve filogenetik analizler sonucunda en yakın akraba oldukları türlerle aralarındaki farklılıklar saptanmıştır. DNA-DNA hibridizasyon analizlerine göre, izolatlar birbirlerine ve yakın akraba oldukları *A. gonensis*, *A. kamchatkensis*, *A. salavatliensis* ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* türlerine % 70'den fazla DNA homolojisi göstermişlerdir. Tüm hibridizasyon analizleri neticesinde, izolatların ve bu referans türlerin tek bir türe ait bakteriler oldukları kesinlik kazanmıştır. Ayrıca, amilolitik aktivite gösteren *Anoxybacillus* cinsi 17 bakterinin, GH13 familyası enzimlerini kodlayan 15 α-amilaz ve 2 CGTaz genleri dizilenerek, annotasyon çalışmaları yapılmış ve GenBank veri tabanına kaydedilmiştir. Bu enzimlerin olası amino asit dizilerinin filogenetik ve *in siliko* analizleri de gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışması ile *Anoxybacillus* cinsinin taksonomik revizyonuna önemli katkılar sağlayacak veriler elde edilmiş, özellikle endüstriyel anlamda katma değeri olabilecek ve yeni araştırmalara kaynak oluşturabilecek *Anoxybacillus* cinsi termostabil α-amilaz ve CGTaz üreticisi suşlara ait gen kaynakları belirlenerek literatüre kazandırılmıştır.

2017, 272 sayfa

Anahtar Kelimeler: Termofilik *Anoxybacillus*, polifazik taksonomi, α-amilaz aktivitesi, α-amilaz geni

ABSTRACT

PhD Thesis

Identification of thermophilic amylase producing *Anoxybacillus* isolates proposed as novel bacterial species by using phenotypic, chemotaxonomic and molecular taxonomic approaches

Emine Derebay Yıldız

Ankara University The Institute of Biotechnology

Assoc. Prof. Arzu Çöleri Cihan

As a result of species identification studies, *Anoxybacillus* sp. isolates, E184aa and E208a were identified as thermophilic, Gram (+), facultative anaerobic, endospore-forming, motile bacilli with high quantitative amylolytic activity. Phylogenetic analyses based on the 16S rRNA gene sequences revealed that isolates showed the greatest sequence similarity to each other (99.4%) and the type strains of *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*, *A. salavatliensis*, *A. kamchatkensis*, *A. ayderensis* ve *A. gonensis* (97.9-98.7%). The optimum growth parametres were determined of E184aa (55°C, pH 7.5, 1.0-1.5% NaCl) and E208a (55°C, pH 7.0, 0.5-1.0% NaCl) isolates. It was found that the major menaquinone was MK-7, the dominant cellular fatty acids were iso-$C_{15:0}$ and iso-$C_{17:0}$ in their cell membranes, and the diagnostic diamino acid was *meso*-Dpm in their cell walls. The genomic DNA G+C contents of E184aa and E208a isolates were 41.9 and 42.2 mol %, respectively. Their differences between closely related species were determined with morphological, physiological, chemotaxonomical tests and *Hae*III-ARDRA, ITS-PCR, $(GTG)_5$-PCR and phylogenetic analyses. According to the results of DNA-DNA hybridization analyses, the isolates showed DNA homologies higher than 70% with each other and *A. gonensis*, *A. kamchatkensis*, *A. salavatliensis* ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*, the closest relatives of isolates. As a result of all hybridization analyzes, it became clear that the isolates and these reference strains were bacterial strains of a single species. Also, 15 α-amylase and 2 CGTase genes encoding GH13 family enzymes of 17 *Anoxybacillus* strains having amylolytic activity were sequenced, annotation studies were performed, and were recorded in the GenBank database. Phylogenetic and *in silico* analyzes of probable amino acid sequences of these enzymes have also been carried out. In conclusion, data were obtained to provide significant contribution to the taxonomic revision of genus *Anoxybacillus* and the genetic resources of strains producing thermostable α-amylase and CGTase genes of genus *Anoxybacillus*, that could be especially important in terms of industry and a source for new researches, have been included in the literature.

2017, 272 pages

Key words: Thermophilic *Anoxybacillus*, polyphasic taxonomy, α-amylase activity, α-amylase gene

TEŞEKKÜR

Beni bu konuda çalışmaya yönlendiren, tez çalışmamın her aşamasında değerli bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek, sonsuz destek ve sabır gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a,

Doktora tez izleme komitemde yer alan ve tezin ilerleyişi sırasında bana her konuda destek sağlayan Sayın Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ'e (Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi) ve Sayın Prof. Dr. Birgül ÖZCAN'a (Mustafa Kemal Üniversitesi),

Tez çalışmam süresince hem deneysel aşamalarda hem de beşeri ilişkiler anlamında bana destek olan Arş. Gör. Başar KARACA, Arş. Gör. Ergin ŞAHİN ve Ankara Üniversitesi, Mikrobiyoloji ABD laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma,

Her konudaki destekleriyle bana güç veren sevgili arkadaşlarım Seda ŞİRİN, Tuğba KILIÇ, Tuğçe BAŞER ve Zeynep ÖZKÖK'e,

Her konuda gösterdikleri karşılıksız özveri ve maddi-manevi her türlü destekle beni bugünlere getiren canım anneme ve babama, bu zorlu süreçte beni hiç yalnız bırakmayan sevgili eşime ve onunla ilgilenemediğim her dakikanın hakkını vermeye söz verdiğim yaşam kaynağım, biricik meleğim, kızım İrem'ime sonsuz minnettarlarımı sunarım.

Bu tez çalışmasına 115R001 numaralı 3001 projesi kapsamında destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN .....HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

ÖZET ..... **İİİ**

ABSTRACT ..... **İV**

TEŞEKKÜR ..... **V**

İÇİNDEKİLER ..... **Vİ**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **XV**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **XİX**

SİMGELER DİZİNİ ..... **XXİİİ**

1. GİRİŞ **1**

2. KURAMSAL TEMELLER **4**

2.1. TERMOFİLİK BASİLLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ **4**

2.2. *ANOXYBACILLUS* CİNSİ **6**

2.2.1. *ANOXYBACILLUS* CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ **6**

2.2.2. *ANOXYBACILLUS* CİNSİNİN TERMAL STABİLİZASYONU **11**

2.2.3. *ANOXYBACILLUS* CİNSİNİN BİYOTEKNOLOJİK ÖNEMİ **13**

2.2.4. *ANOXYBACILLUS* TÜRLERİNİN α-AMİLAZ AKTİVİTESİNE YÖNELİK YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR **15**

2.2.5. *ANOXYBACILLUS* CİNSİNE AİT TÜR VE ALT TÜRLERİN TANIMLANMASINA YÖNELİK YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR **18**

2.3. BAKTERİYEL TAKSONOMİDE TÜR TANIMLAMASI **27**

2.3.1. FENOTİPİK ÖZELLİKLER **31**

2.3.1.1. Mikroskobik Morfoloji 31

2.3.1.2. Makroskobik Morfoloji 32

2.3.1.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikler 32

2.3.2. KEMOTAKSONOMİK ÖZELLİKLER 33

2.3.2.1. Hücre Duvarındaki Peptidoglikan Yapısının İncelenmesi 33

2.3.2.2. Hücre Membran Yapısının İncelenmesi 34

2.3.2.2.1. Yağ Asitleri ve Türevleri 34

2.3.2.2.2. Polar Lipidler 35

2.3.2.2.3. Kinon Yapıları 35

2.3.2.3. Diğer Tanılayıcı Yöntemler 36

2.3.3. GENOTİPİK ÖZELLİKLER 36

2.3.3.1. 16S rRNA Gen Dizi Analizi 36

2.3.3.2. ITS (Internal Transcribed Spacer) Bölgeleri 38

2.3.3.3. Genomik Parmak İzi Teknikleri 39

2.3.3.4. REP (Tekrarlanan Ekstragenik Palindromik) Elementler 40

2.3.3.5. Çoğaltılmış Ribozomal DNA Geni Restriksiyon Analizi (ARDRA-Amplified rDNA restriction analysis) 44

2.3.3.6. DNA-DNA Hibridizasyonu (DDH) 46

2.3.3.7. DNA Baz Kompozisyonu: % G+C İçeriği 48

2.4. α-AMİLAZLAR 49

2.4.1. AMİLAZLARIN SINIFLANDIRILMASI 49

2.4.1.1. CAZy (Carbohydrate Active Enzymes) Sınıflandırma Sistemi ve α-Amilazlar ..50

2.4.1.2. α-Amilaz Enzim Ailesi 50

2.4.2. NİŞASTANIN YAPISI VE BİYODEGRADASYONU 53

2.4.3. α-AMİLAZLARIN YAPISI VE KATALİTİK MEKANİZMASI 57

2.4.3.1. Domain Yapısı 57

2.4.3.2. Aktif Bölge 59

2.4.3.3. Korunmuş Dizi Bölgeleri 61

2.4.3.4. Kalsiyum İyonları 65

2.4.3.5. Katalitik Mekanizma 65

2.4.4. MİKROBİYAL α-AMİLAZ KAYNAKLARI 67

2.4.5. α-AMİLAZLARIN BİYOTEKNOLOJİK VE ENDÜSTRİYEL UYGULAMA ALANLARI 70

2.4.6. *ANOXYBACILLUS* TÜRLERİNDEN α-AMİLAZ GENİNİN İZOLASYONUNA YÖNELİK YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR 71

2.4.7. SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZLAR 71

2.4.7.1. Siklodekstrin Glukanotransferazların Yapısı 71

2.4.7.2. Siklodekstrin Glukanotransferazların Katalizlediği Reaksiyonlar 74

2.4.7.3. Mikrobiyal Siklodekstrin Glukanotransferaz Kaynakları 76

2.4.7.4. Siklodekstrin Glukanotransferazlardaki Dizi Benzerlikleri 78

2.4.7.5. Siklodekstrin Glukanotransferazları α-Amilazlardan Ayıran Karakteristik Dizi Farklılıkları 79

3. GEREKÇE VE AMAÇ 81

4. MATERYAL VE YÖNTEM 83

4.1. MATERYAL 83

4.1.1. BAKTERİ İZOLATLARI VE REFERANS TÜRLER 83

4.1.1.1. Referans Termofilik *Anoxybacillus* Türleri 83

4.1.1.2. *Anoxybacillus* Cinsi Bakteri İzolatları 83

4.1.2. BESİYERLERİ 85

4.1.3. TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER 86

4.1.3.1. Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler 86

4.1.3.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Agaroz Jeller 87

4.1.3.3. α-Amilaz Aktivitesinin Kantitatif Tayininde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler 88

4.1.3.4. Gitschier Tamponu (5X) 88

4.1.4. KİMYASALLAR 88

4.1.5. KİTLER 89

4.1.6. MOLEKÜLER VE FİLOGENETİK ANALİZLERDE KULLANILAN BİYOİNFORMATİK ARAÇLAR 90

4.1.7. KULLANILAN MAKİNE-TEÇHİZAT 90

4.2. YÖNTEM 91

4.2.1. GENOTİPİK ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ 91

4.2.1.1. Genomik DNA İzolasyonu 91

4.2.1.2. 16S rRNA Geninin PCR ile Çoğaltılması 92

4.2.1.3. 16S rRNA Gen Dizilerinin Filogenetik Analizleri 94

4.2.1.4. PCR Temelli Genomik Parmak İzi Teknikleri ve Filogenetik Analizler 94

4.2.1.4.1. Çoğaltılmış Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA) 94

4.2.1.4.2. İntergenik 16S-23S rRNA Gen Dizilerinin PCR Reaksiyonu (ITS-PCR) 95

4.2.1.4.3. Tekrarlı Palindromik $(GTG)_5$ ve BOX Dizilerinin PCR ile Çoğaltılması (*Rep*-PCR) 96

4.2.1.4.4. ARDRA, ITS-PCR, BOXA1-PCR ve $(GTG)_5$-PCR Reaksiyonları Sonucu Elde Edilen Moleküler Verilerin Filogenetik Analizleri 98

4.2.2. KLASİK FENOTİPİK ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ 98

4.2.2.1. Hücre ve Koloni Morfolojileri, Hareketlilik ve Spor Oluşturma Özellikleri 98

4.2.2.2. Optimum Üreme pH'sı.....99

4.2.2.3. Optimum Üreme Sıcaklığı 99

4.2.2.4. Tuz Toleranslarının Belirlenmesi 99

4.2.2.5. Antibiyogram.....99

4.2.2.6. Biyokimyasal Testler 100

4.2.3. YENİ BAKTERİ TÜRLERİ OLDUKLARI ÖNGÖRÜLEN *ANOXYBACILLUS* CİNSİ İZOLATLARIN GENOTİPİK VE KEMOTAKSONOMİK YÖNTEMLERLE TÜR SEVİYESİNDE TANIMLANMASI 101

4.2.3.1. Hücre Membran Yapısının İncelenmesi 102

4.2.3.1.1. Toplam Hücre Yağ Asiti ve Kinon Analizleri.....102

4.2.3.1.2. Polar Lipid Analizi.....102

4.2.3.2. Diaminopimelik Asit (DAP) İçeriğinin Belirlenmesi.....103

4.2.3.3. % G+C İçeriğinin Belirlenmesi.....103

4.2.3.4. DNA-DNA Hibridizasyon Analizleri 103

4.2.4. α-AMİLAZ AKTİVİTESİNİN KALİTATİF VE KANTİTATİF TAYİNİ ...104

4.2.4.1. α-Amilaz Aktivitesinin Kalitatif Tayini.....104

4.2.4.2. α-Amilaz Aktivitesinin Kantitatif Tayini.....104

4.2.4.2.1. Kalitatif Olarak Amilolitik Aktivite Gösteren Basillerde Hücre Dışı Amilaz Üretimi..... 104

4.2.4.2.2. Maltozun Ekstinksiyon Katsayısının Hesaplanması.....105

4.2.4.2.3. Kantitatif α-Amilaz Aktivite Tayini.....105

4.2.4.2.4. Enzim Ünitesinin Tanımı 106

4.2.5. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ GEN BÖLGELERİNİN MOLEKÜLER, FİLOGENETİK VE *IN SİLİKO* TEKNİKLERLE ANALİZLERİ 107

4.2.5.1. α-Amilaz ve Siklodekstrin Glukanotransferaz Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması ve Dizi Analizleri 107

4.2.5.2. α-Amilaz ve Siklodekstrin Glukanotransferaz Genlerinin Annotasyonu ve GenBank Aksesyon Numaralarının Temini 110

4.2.5.3. α-Amilaz ve Siklodekstrin Glukanotransferaz Amino Asit Dizilerinin Filogenetik Analizleri 111

4.2.5.4. α-Amilaz ve Siklodekstrin Glukanotransferaz Amino Asit Dizilerinin *In Siliko* Tekniklerle Analizleri 111

5. ARAŞTIRMA BULGULARI 112

5.1. GENOTİPİK ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK GERÇEKLEŞTİRİLEN ANALİZLERİN SONUÇLARI 112

5.1.1. GENOMİK DNA İZOLASYONU 112

5.1.2. 16S rRNA GENİNİN PCR İLE ÇOĞALTILMASI 113

5.1.3. 16S rRNA GEN DİZİLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZLERİ 114

5.1.4. PCR TEMELLİ GENOMİK PARMAK İZİ TEKNİKLERİ VE FİLOGENETİK ANALİZLER 118

5.1.4.1. Çoğaltılmış Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA) 118

5.1.4.2. İntergenik 16S-23S rRNA Gen Dizilerinin PCR Reaksiyonu (ITS-PCR) 120

5.1.4.3. Tekrarlı Palindromik $(GTG)_5$ ve BOX Dizilerinin PCR ile Çoğaltılması (*Rep*-PCR) 120

5.1.4.4. ARDRA, ITS-PCR, BOXA1-PCR ve $(GTG)_5$-PCR Reaksiyonları Sonucu Elde Edilen Moleküler Verilerin Filogenetik Analizleri 123

5.2. KLASİK FENOTİPİK ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK GERÇEKLEŞTİRİLEN TÜM ANALİZLERİN SONUÇLARI 125

5.2.1. HÜCRE VE KOLONİ MORFOLOJİLERİ, HAREKET YETENEKLERİ VE SPOR YAPILARI 125

5.2.2. FARKLI pH, SICAKLIK VE TUZ KONSANTRASYONLARINDAKİ ÜREMELERİ VE BAZI BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI 129

5.2.3. API-20E VE API-50CH KİTLERİYLE GERÇEKLEŞTİRİLEN BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI 131

5.2.4. ANTİBİYOGRAM SONUÇLARI 133

5.3. İZOLATLARIN TÜR SEVİYESİNDE TANIMLANMASI İÇİN HİZMET ALIMI ŞEKLİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN DİĞER GENOTİPİK VE KEMOTAKSONOMİK ANALİZLERİN SONUÇLARI 135

5.3.1. E184aa VE E208a İZOLATLARININ TOPLAM HÜCRE YAĞ ASİTİ ANALİZİ SONUÇLARI 135

5.3.2. E184aa VE E208a İZOLATLARININ MENAKİNON ANALİZ SONUÇLARI 136

5.3.3. E184aa VE E208a İZOLATLARININ POLAR LİPİD ANALİZİ SONUÇLARI 136

5.3.4. E184aa VE E208a İZOLATLARININ DİAMİNOPİMELİK ASİT (DAP) ANALİZİ SONUÇLARI 137

5.3.5. E184aa VE E208a İZOLATLARININ GENOMLARINDAKİ % G+C İÇERİĞİ SONUÇLARI 137

5.3.6. E184aa VE E208a İZOLATLARININ DNA-DNA HİBRİDİZASYON ANALİZİ SONUÇLARI 137

5.4. E184aa VE E208a İZOLATLARININ ULUSLARARASI İKİ KÜLTÜR KOLEKSİYONUNDAN ALINAN KÜLTÜR KOLEKSİYON NUMARALARI 140

5.5. α-AMİLAZ AKTİVİTESİNİN KALİTATİF VE KANTİTATİF ANALİZ SONUÇLARI 141

5.5.1. α-AMİLAZ AKTİVİTESİNİN KALİTATİF TAYİNİ 141

5.5.2. α-AMİLAZ AKTİVİTESİNİN KANTİTATİF TAYİNİ 141

5.6. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ GEN BÖLGELERİNİN PCR İLE ÇOĞALTILMASI, DİZİLENMESİ, ANNOTASYONU, GENBANK AKSESYON NUMARALARININ TEMİNİ, AMİNO ASİT DİZİLERİNİN FİLOGENETİK VE *IN SİLİKO* ANALİZLERİNE AİT SONUÇLAR..... 149

5.6.1. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ GEN BÖLGELERİNİN PCR İLE ÇOĞALTILMASI VE DİZİ ANALİZLERİ 149

5.6.2. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ GENLERİNİN ANNOTASYONU VE GENBANK AKSESYON NUMARALARININ TEMİNİ..... 152

5.6.3. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ GEN DİZİLERİNİN GENBANK AKSESYON NUMARALARI 164

5.6.4. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ AMİNO ASİT DİZİLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZLERİ 164

5.6.5. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ AMİNO ASİT DİZİLERİNİN *IN SİLİKO* ANALİZLERİ 173

6. TARTIŞMA VE SONUÇ..... 202

6.1. TARTIŞMA 202

6.1.1. E184aa VE E208a KODLU *ANOXYBACILLUS* CİNSİ İZOLATLARIN KLASİK, KEMOTAKSONOMİK VE GENOTİPİK ANALİZLERLE TÜR TEŞHİSLERİ 202

6.1.2. *ANOXYBACILLUS* CİNSİ İZOLATLARIN VE REFERANSLARIN AMİLOLİTİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ, α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ GENLERİNİN ÇOĞALTILMASI, DİZİLENMESİ, GENBANK AKSESYON NUMARALARININ ALINMASI, AMİNO ASİT DİZİLERİNİN FİLOGENETİK VE *IN SİLİKO* ANALİZLERİ 212

6.2. SONUÇ..... 221

7. KAYNAKLAR..... 224

8. EKLER.....262

9. ÖZGEÇMİŞ.....263

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....265

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Termofillerin optimum üreme sıcaklık değerleri (37) 5

Şekil 2.2. *Anoxybacillus* cinsinin taksonomik sınıflandırılması (69) 7

Şekil 2.3. 55°C'de üretilmiş *Anoxybacillus calidus* türüne ait hücrelerin faz-kontrast mikrografisi (71) 8

Şekil 2.4. Çoğaltılan 16S ve 23S rDNA gen bölgesi arasındaki ITS bölgesinin 30S pre-rRNA geni üzerindeki gösterimi (178) 39

Şekil 2.5. *Rep*-PCR genomik parmak izi tekniği (199) 44

Şekil 2.6. Çoğaltılmış ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA) (212) 46

Şekil 2.7. Nişastanın yapısındaki iki glukoz polimeri: (a) amiloz ve (b) amilopektin (250) 54

Şekil 2.8. Nişastanın glukozid hidrolaz familyasındaki enzimlerle hidrolizi (251) 55

Şekil 2.9. *Aspergillus oryzae* α-amilazı, Taka-amilaz A (TAA)'nın (253) sekonder yapı elemanları (257) 58

Şekil 2.10. (a) *Aspergillus oryzae* α-amilazı, Taka-amilaz A'nın (PDB ID: 2TAA; 253) üç-boyutlu yapısı; (b) GH13 enzim ailesine ait α-amilazların karakteristik yapısı (261) 59

Şekil 2.11. α-Amilaz enzim ailesinin aktif bölgesinde yer alan substrat bağlanma alt bölgeleri (264) 60

Şekil 2.12. α-Amilaz enzim ailesindeki korunmuş dizi bölgeleri (245). 64

Şekil 2.13. α-Amilaz enzim ailesinin ikili-yer değiştirme katalitik mekanizması (264). 67

Şekil 2.14. *Bacillus circulans* 8 suşunun siklodekstrin glukanotransferazının (286) sekonder yapı elemanları (257) 72

Şekil 2.15. *Bacillus circulans* 251 siklodekstrin glukanotransferaz enziminin üç boyutlu yapısı (PDB ID: 1CXK; 266) 74

Şekil 2.16. Siklodekstrin glukanotransferazların katalizlediği reaksiyonların şematik gösterimi (301, 312) 76

Şekil 2.17. α-Amilazlar ve siklodekstrin glukanotransferazlardaki korunmuş dizi bölgelerinin karşılaştırılması (331, 257) 80

Şekil 4.1. Tez kapsamında uygulanan yöntemlerin akış şeması 91

Şekil 5.1. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin 27F ve 1492R primerleri kullanılarak elde edilen 16S rRNA-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi 113

Şekil 5.2. E208a ve E184aa kodlu izolatlar ile en çok akrabalık gösterdikleri *Anoxybacillus* cinsine ait endospor oluşturan temsilci üyelerin 16S rRNA gen dizileri temel alınarak, Neighbour-joining metodu ile Mega 6 programı kullanılarak oluşturulmuş, evrimsel uzaklığı gösteren filogenetik ağaç 116

Şekil 5.3. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürünlerinin *Alu*I restriksiyon enzimiyle kesimi sonrası elde edilen bantların jel elektroforez görüntüleri 118

Şekil 5.4. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürünlerinin *Hae*III restriksiyon enzimiyle kesimi sonrası elde edilen bantların jel elektroforez görüntüleri 119

Şekil 5.5. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürünlerinin *Taq*I restriksiyon enzimiyle kesimi sonrası elde edilen bantların jel elektroforez görüntüleri 119

Şekil 5.6. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin S-D-Bact-1494-a-S-20 ve L-D-Bact-0035-a-A-15 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen ITS-PCR ürünlerinin jel elektroforezdeki bant profilleri 120

Şekil 5.7. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin $(GTG)_5$ primeri kullanılarak gerçekleştirilen $(GTG)_5$-PCR ürünlerinin jel elektroforezdeki bant profilleri 121

Şekil 5.8. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin tekrarlanan $(GTG)_5$-PCR ürünlerinin jel elektroforezdeki bant profilleri 121

Şekil 5.9. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin BOXA1R primeri kullanılarak gerçekleştirilen BOX-PCR ürünlerinin jel elektroforezdeki bant profilleri 122

Şekil 5.10. *Anoxybacillus* referans türlerinin tekrarlanan BOX-PCR ürünlerinin jel elektroforezdeki bant profilleri 122

Şekil 5.11. *Anoxybacillus* cinsine dahil E184aa ve E208a kodlu izolatlar ve referans suşların *Alu*I, *Hae*III ve *Taq*I ARDRA bant profilleri ile ITS-PCR, BOXA1 ve $(GTG)_5$-PCR DNA parmak izi profillerinin topluca ele alındığı filogenetik ağaç 124

Şekil 5.12. a. E184aa ve b. E208a izolatlarının MI sıvı besiyerinde 55°C'de 18 saat üretilen kültürlerine ait ışık mikroskobu görüntüleri 127

Şekil 5.13. a. E184aa izolatına ait peritriş flagella yapısı ve b. E208a izolatına ait monotriş flagella yapısının ışık mikroskobu görüntüleri 128

Şekil 5.14. a. E184aa ve b. E208a izolatlarının MI besiyerinde 55°C'de 18 saat üretilen saf kültürlerine ait petri görüntüleri 128

Şekil 5.15. a. E184aa ve b. E208a izolatlarının polar lipid içeriklerini gösteren TLC kromatografisi görüntüleri 136

Şekil 5.16. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin (a) kantitatif α-amilaz aktivitesi (U/mL) sonuçları ve (b) kantitatif α-amilaz aktivitesi/biyokütle (U/g) değerleri 148

Şekil 5.17. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin amy primerleri kullanılarak elde edilen α-amilaz geni-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi 149

Şekil 5.18. *Anoxybacillus* referans türlerinin d-amy (a ve b) ve cgt (c) primerleri kullanılarak elde edilen amilaz süperfamilyasına ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi 151

Şekil 5.19. *Anoxybacillus* α-amilaz (amy) ve siklodekstrin glukanotransferaz (cgt) amino asit dizilerinin en çok benzerlik gösterdikleri referans amino asit dizileri (*) temel alınarak, Neighbour-joining metoduna göre oluşturulmuş ve evrimsel uzaklığı gösteren filogenetik ağaç 170

Şekil 5.20. Tez kapsamında elde edilen olası α-amilaz amino asit dizileri (Amy) ile karşılaştırma amacıyla kullanılan referans α-amilaz enzimlerinin (Amy*) amino asit dizi hizalaması ve korunmuş dizi bölgeleri.....174

Şekil 5.21. Tez kapsamında elde edilen olası siklodekstrin glukanotransferaz (CGTaz) amino asit dizileri (Cgt) ile karşılaştırma amacıyla kullanılan referans CGTaz enzimlerinin (Cgt*) amino asit dizi hizalaması ve korunmuş dizi bölgeleri 191

Şekil 5.22. (a) Tüm α-amilaz amino asit dizilerinin E184aa amilaz dizisine göre hizalanması sonucu elde edilen korunmuş dizi bölgeleri; (b) Tüm siklodekstrin gukanotransferaz (CGTaz) amino asit dizilerinin *A. rupiensis* DSM17127 CGTaz dizisine göre hizalanması sonucu elde edilen korunmuş dizi bölgeleri 199

Şekil 5.23. *Anoxybacillus* cinsi α-amilaz amino asit dizilerinden elde edilen korunmuş dizi bölgelerinin a) tek tek ve b) topluca gösterildiği dizi logoları 200

Şekil 5.24. *Anoxybacillus* cinsi siklodekstrin gukanotransferaz amino asit dizilerinden elde edilen korunmuş dizi bölgelerinin a) tek tek ve b) topluca gösterildiği dizi logoları.....201

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çeşitli *Anoxybacillus* türlerinden saflaştırılmış bazı enzimlerin temel biyokimyasal özellikleri (67) 14

Çizelge 2.2. Literatürde yer alan tanımlanmış tüm *Anoxybacillus* tür ve alttürleri ile bazı taksonomik özellikleri [Goh ve ark.'nın çalışmasındaki veriler (67) güncellenerek sunulmuştur] 20

Çizelge 2.3. Aerobik endospor oluşturan bakterilerin yeni taksonlarının tanımlanmasında kullanılan standart özellikler (54) 29

Çizelge 2.4. α-Amilaz enzim ailesinin üyeleri (klan GH-H) (245) 52

Çizelge 4.1. Tez kapsamında kullanılan *Anoxybacillus* izolatları ve referans türler 84

Çizelge 4.2. Tez kapsamında kullanılan tüm kimyasalların listesi 88

Çizelge 4.3. Amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz gen dizilerinin biyoinformatik araçlarla işlenmesinde ve filogenetik analizlerinde kullanılan yazılım programları 90

Çizelge 4.4. 16S rRNA PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizi bilgileri 93

Çizelge 4.5. 16S rRNA geninin çoğaltılması için uygulanan PCR protokolü 93

Çizelge 4.6. 16S rRNA geninin çoğaltılması için uygulanan PCR reaksiyon koşulları 93

Çizelge 4.7. *Alu*I, *Hae*III ve *Taq*I restriksiyon endonükleaz enzimlerinin çift iplikli DNA'daki kesim bölgeleri 94

Çizelge 4.8. 16S rRNA PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonları (ARDRA) için uygulanan protokol 95

Çizelge 4.9. Restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen kesim reaksiyon koşulları 95

Çizelge 4.10. ITS-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizi bilgileri 95

Çizelge 4.11. ITS-PCR reaksiyonu için uygulanan protokol 96

Çizelge 4.12. ITS-PCR reaksiyon koşulları 96

Çizelge 4.13. $(GTG)_5$-PCR ve BOX-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizi bilgileri 96

Çizelge 4.14. $(GTG)_5$-PCR ve BOX-PCR reaksiyonları için uygulanan protokol.....97

Çizelge 4.15. $(GTG)_5$-PCR reaksiyon koşulları 97

Çizelge 4.16. BOX-PCR reaksiyon koşulları.....97

Çizelge 4.17. E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilen kemotaksonomik ve genotipik analizleri.....101

Çizelge 4.18. α-Amilaz-PCR ve siklodekstrin glukanotransferaz-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizi bilgileri.....108

Çizelge 4.19. α-Amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz genlerinin çoğaltılması için uygulanan PCR protokolü ($MgCl_2$ son konsantrasyonu 2 mM).....109

Çizelge 4.20. α-Amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz genlerinin çoğaltılması için uygulanan PCR protokolü ($MgCl_2$ son konsantrasyonu 2.5 mM).....109

Çizelge 4.21. α-Amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz geninin çoğaltılması için uygulanan PCR reaksiyon koşulları.....109

Çizelge 5.1. Tez kapsamında çalışılan tüm *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin DNA konsantrasyonları.....112

Çizelge 5.2. *Anoxybacillus* cinsi izolatların 16S rRNA gen dizi uzunlukları ve güncellenmiş GenBank aksesyon numaraları.....114

Çizelge 5.3. E184aa ve E208a kodlu izolatların en çok benzerlik gösterdikleri *Anoxybacillus* cinsine ait referans türlerle 16S rRNA gen dizi benzerlik oranları.....115

Çizelge 5.4. İzolatlar ve filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerin hücre ve koloni morfolojileri, hareket yetenekleri ve spor yapıları.....126

Çizelge 5.5. İzolatların ve filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerin farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarındaki üremeleri ve bazı biyokimyasal test sonuçları.....130

Çizelge 5.6. İzolatların ve filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerin API-20E ve API-50CH kitleriyle gerçekleştirilen biyokimyasal test sonuçları 131

Çizelge 5.7. İzolatların ve filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerin antibiyogram sonuçları.....134

Çizelge 5.8. E184aa ve E208a izolatlarının toplam hücre yağ asiti oranları.....135

Çizelge 5.9. E184aa ve E208a izolatlarının menakinon analizi sonuçları 136

Çizelge 5.10. E184aa ve E208a izolatlarının polar lipid analizi sonuçları 136

Çizelge 5.11. E184aa ve E208a izolatlarının genomik DNA ve 16S rRNA % G+C içerikleri 137

Çizelge 5.12. E184aa ve E208a izolatlarının birbirleri ve en çok 16S rRNA gen dizi homolojisi gösterdiği referans türlerle ve bu referans türlerin birbirleri ile gerçekleştirilen DNA-DNA hibridizasyon çiftlerinin benzerlik oranları 140

Çizelge 5.13. *A. gonensis* NCIMB 13933^{T}, *A. ayderensis* NCIMB 13972^{T}, *A. kamchatkensis* DSM 14988^{T}, *A. salavatliensis* DSM 22626^{T} ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^{T} referans türlerinin daha önceki literatür çalışmalarında birbirleri ile gerçekleştirilen DNA-DNA hibridizasyon çiftlerinin benzerlik oranları 140

Çizelge 5.14. İzolatların ve referansların kalitatif ve kantitatif α-amilaz aktivitesi sonuçları 142

Çizelge 5.15. Dizilenen genlerin NCBI-CDS programı kullanılarak elde edilen yapısal analizlerine ait bulgular ve gruplandırıldıkları enzim sınıfları.....154

Çizelge 5.16. Dizilenen α-amilaz genleri ile ilişkilendirilmiş korunmuş domainler ve GenBank veri tabanında en çok benzerlik gösterdikleri referans suşların gen dizileri ile aralarındaki benzerlik oranları.....155

Çizelge 5.17. Dizilenen siklodekstrin glukanotransferaz genleri ile ilişkilendirilmiş korunmuş domainler ve GenBank veri tabanında en çok benzerlik gösterdikleri referans suşların gen dizileri ile aralarındaki benzerlik oranları.....163

Çizelge 5.18. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz gen dizilerinin uzunlukları ve GenBank aksesyon numaraları 164

Çizelge 5.19. Filogenetik analizlerde kullanılan ve NCBI-BLASTP taraması sonucunda dizilerimize en çok benzerlik gösterdiği belirlenen *Anoxybacillus* cinsi veya onunla ilişkili bakterilere ait GH13 familyasına dahil α-amilaz, siklodekstrin glukanotransferaz ile 3 dış grup gen/amino asit dizilerine dair bilgiler 166

Çizelge 5.20. α-Amilaz (amy) ve siklodekstrin glukanotransferaz (cgt) amino asit dizileri ile GenBank veri tabanında en çok benzerlik gösterdikleri referans türlerin (*) Neighbour-joining metodu kullanılarak oluşturulan dizi benzerlik matriksi.....167

Çizelge 5.21. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin α-amilaz ve CGTaz amino asit dizilerinin en çok benzerlik gösterdikleri referans amino asit dizileri (*) temel alınarak Neighbour-joining metoduna göre oluşturulmuş filogenetik kladlar ve özellikleri 172

Çizelge 6.1. E184aa ve E208a izolatlarının ve en çok 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdikleri referans türlerin ayırt edici özellikleri 204

Çizelge 6.2. α-Amilaz amino asit dizilerinde tespit edilen karakteristik özellikler.....217

Çizelge 6.3. Siklodekstrin glukanotransferaz amino asit dizilerinde tespit edilen karakteristik özellikler.....220

SİMGELER DİZİNİ

ARDRA	Çoğaltılmış ribozomal DNA restriksiyon analizi
ATCC	American Type Culture Collection
bç	Baz çifti
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAZy	Carbohydrate Active Enzymes
CDS	Korunmuş domain araması
CGTaz	Siklodekstrin glukanotransferaz
CSR	Korunmuş dizi bölgesi
DAP	Diaminopimelik asit
DDH	DNA-DNA hibridizasyonu
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
ERIC	Enterobakteriyel intergenik tekrar eden konsensus
GH	Glikozid Hidrolaz
ITS	İntergenik transkribe edilmiş ayırıcı
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MBS	Maltoz bağlanma bölgesi
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCIMB	National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
REP	Tekrarlanan ekstragenik palindrom
TAA	Taka-amilaz A
TIM	Trioz fosfat izomeraz

1. GİRİŞ

Bakteriyel taksonomi üç alt disiplin içermektedir: (i) sınıflandırma (organizmaların benzerlikleri esas alınarak taksonomik gruplara ayrılmaları); (ii) adlandırma (tanımlanan taksonomik birimlerin isimlendirilmesi) ve (iii) bilinmeyen organizmaların tanımlanarak, daha önce tanımlanan ve isimlendirilen mevcut taksonomik gruplardan birine dahil edilmesi (teşhis). Modern mikrobiyal sistematik analizlerin yürütülebilmesi için ilave olarak iki alt disipline daha ihtiyaç vardır: filogeni ve popülasyon genetiği. Bakteriyel taksonomi, teşhis ve tanımlamada geleneksel olarak çoğunlukla fenotipik analizlerin karşılaştırılması üzerine odaklanmaktadır. Günümüzde ise, özellikle 16S rRNA gen dizileri gibi genetik bilginin yaygın olarak kullanımı, taksonominin filogenetik akrabalık ilişkilerini yansıtmasına imkan sağlamaktadır (1, 2).

Günümüzde yeni bir bakteriyel tür fenotipik, genotipik ve kemotaksonomik özelliklerinin belirlendiği polifazik bir yaklaşım kullanılarak tanımlanmaktadır (3, 4). Bu işlemde, genetik bilgi, farklı hücre soyları arasındaki evrimsel ilişkiler üzerine ışık tutacağından, genotipik karakterizasyon türlerin tanımlanmasında önemli bir yer tutmaktadır. 16S rRNA gen dizilerine ve diziler arasındaki benzerliklerin belirlenmesine dayalı filogenetik analizler, bakteri türlerinin tanımlanmasında ilk aşama olarak rutin bir şekilde kullanılır (4, 5, 6). Bunun yanı sıra, iki genom arasındaki genetik benzerlik derecesinin dolaylı olarak belirlenmesini sağlayan DNA-DNA hibridizasyon tekniği (DDH), uzun yıllardan beri bakteri türlerinin tanımlanmasında altın standart olarak kullanılmaktadır (7). Yeni bir bakteri türünün tanımlanmasında en yaygın kullanılan metodolojik yaklaşım, 16S rRNA gen dizi analizi ile DNA-DNA hibridizasyon tekniğinin gerektiğinde birlikte kullanılmasıdır. İki suş arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliğinin % 97.0 ve üzerinde olması durumunda DDH tekniğinin kullanılması önerilmektedir (4, 7).

Bacillaceae familyası üyelerinden iyi bilinen *Bacillus* ve *Geobacillus* cinslerinin aksine, *Anoxybacillus* 2000 yılında tanımlanmış yeni bir cinstir. Pikuta ve ark. (2000) tarafından *Bacillus* cinsinden ayrılarak sistematiğe kazandırılan *Anoxybacillus* cinsinin tip suşu *Anoxybacillus pushchinoensis* K1^{T}'dir. *A. pushchinoensis* ilk izole edildiğinde, anaerobik bir bakteri olduğu düşünüldüğünden ''anoksi'' eki cins isminin başına getirilerek isimlendirilmiş, ancak daha sonra yapılan çalışmalarda bu tip suşun oksijensiz ortamların yanı sıra, oksijenli ortamlarda da yaşayabildiği anlaşıldığından *Anoxybacillus* cinsinin

zorunlu anaerob özelliği, aerotolerant anaerob ya da fakültatif anaerob olarak değiştirilmiştir (8, 9).

Anoxybacillus cinsinin üyeleri; Gram-pozitif, endospor oluşturan, çubuk şekilli, aerotolerant aerobik ya da fakültatif anaerobik üreme gösteren termofilik bakteri türlerini içerir (10). *Anoxybacillus* türleri, aynı zamanda hızlı üreme gösteren, ekstrem koşullara dayanıklı ve birçok termostabil enzimin doğal kaynağını oluşturan bakterilerdir. *Anoxybacillus* cinsi içerisinde *A. flavithermus* (11-15), *A. amylolyticus* (16) ve *A. caldiproteolyticus* D504 and D621 (17) türlerinin amilaz ürettikleri bildirilmiştir. Bunların yanı sıra, *Anoxybacillus* spp. KP1, SK3-4, DT3-1, TSSC-1, IB-A, AH1 ve YIM 342 suşlarının da termostabil amilaz ürettikleri bilinmektedir (18-24). Termofilik, alkalitolerant amilazlardan farklı olarak, *A. amylolyticus* türünün asidotermofilik özellikte bir amilaz üreticisi olduğu bildirilmiştir (16). *Anoxybacillus* cinsinin henüz 2000'li yıllarda tanımlanmış olması sebebiyle, literatürde termofilik ve alkali koşullara dayanıklı *Anoxybacillus* türlerinden α-amilaz izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonuna ilişkin sınırlı sayıda çalışma yer almaktadır. *Anoxybacillus* türlerinden izole edilen α-amilazların enzimatik özellikleri ve protein dizisi hakkında da yeterli bilgi mevcut değildir. Dolayısıyla, moleküler yapısının ve enzimatik özelliklerinin daha iyi anlaşılması açısından *Anoxybacillus* sp. türlerinde nişastaya etki eden amilolitik enzimlerin varlığının araştırılması son zamanlarda oldukça önemli bir çalışma alanı haline gelmiştir (18).

α-Amilazlar (EC 3.2.1.1), glikozid hidrolazların 13. familyasına (GH13) ait olup, nişasta molekülü ve ilişkili polisakkarit zincirlerinin iç kısmındaki α-1,4 glukozidik bağlara rastgele etki ederek, onları oligosakkaritlere parçalarlar (25-27). Amilazlar, dünya enzim pazarının yaklaşık % 30'una sahip olup biyoteknolojik öneme sahip bir enzim sınıfıdır. Günümüzde, çok sayıdaki mikrobiyal amilaz ticari olarak kullanılmakta ve büyük çoğunluğu nişasta işleme endüstrisinde nişastanın kimyasal hidrolizinin yerini almıştır. Mikroorganizma kaynaklı amilazlar, bitki ve hayvanlardan elde edilenlere göre daha kararlı bir yapıya sahip olduklarından gıda, tekstil, kağıt, deterjan ve ilaç gibi birçok endüstriyel alanda kullanım potansiyeline sahiptirler (26, 28-30). Siklodekstrin glukanotransferazlar (EC 2.4.1.19) da α-amilazlar gibi GH13 familyasına dahil enzimler olup, nişasta molekülündeki α-1,4-D-glukan zincirinin bir kısmını α-1,4 glukozidik bağla halkasal hale dönüştürürler. Siklodekstrin glukanotransferazlar, nişasta molekülünden siklodekstrin adı verilen 6, 7 veya 8 glukoz ünitesinden oluşan ve siklik D-glikozil birimleri oluşturabilen tek enzim grubudur (31). Bu enzim, başta *Bacillus* ve *Geobacillus*

türleri olmak üzere birçok mikroorganizma tarafından üretilebilmektedir. α-Amilazlar tipik nişasta hidrolizini katalizlerken, siklodekstrin glukanotransferazların üç önemli transglikozilasyon reaksiyonunda (siklizasyon, disproporsiyonasyon ve birleştirme) görev aldığı ve bunun yanı sıra düşük oranda hidrolitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (32). *Anoxybacillus* cinsinin üyeleri arasında siklodekstrin glukanotransferaz üretimine ilişkin sınırlı bilgi bulunmaktadır. Sadece *Anoxybacillus* sp. B2M1 ve B7M1 izolatlarının tüm genom dizilemesinden elde edilen annotasyon çalışmaları sonucunda, siklomaltodekstrin glukanotransferaz ürettikleri bilinmekte ancak, literatürde bu bakterilerdeki enzimin aktivitesine veya karakterizasyonuna yönelik herhangi bir çalışma yer almamaktadır (33).

Tez kapsamında, ilk olarak yeni türler oldukları öngörülen E184aa ve E208a kodlu iki *Anoxybacillus* cinsi bakterinin klasik taksonomik yöntemler (morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler), kemotaksonomik analizler (toplam hücre yağ asiti, kinon, polar lipit ve DAP analizleri) ve tür teşhisinde elzem olan bazı genotipik analizler (16S rRNA gen dizi analizi, 16S-ARDRA, ITS-PCR, *Rep*-PCR genomik parmak izi analizleri, genomik DNA'nın % G+C içeriği ve DNA-DNA hibridizasyon testleri) gerçekleştirilerek türleri kısmen tanımlanmıştır. Elde edilen şaşırtıcı veriler, yeni bakteri türlerinin tanımlanmasına değil ancak, *Anoxybacillus* cinsinin literatürdeki mevcut taksonomik pozisyonunun net olarak belirlenmesine önemli katkılar sağlayacak nitelikte olup, *Anoxybacillus* cinsine ait bazı taksonomik revizyonların yapılması gereksinimini ortaya çıkarması bakımından önem arz etmektedir. Bunun yanı sıra, tezin diğer amacına yönelik olarak, kalitatif ve kantitatif α-amilaz aktivitesi gösterdiği belirlenen *Anoxybacillus* cinsine ait 17 bakterinin 15 α-amilaz ve 2 siklodekstrin glukanotransferaz geni dizilenerek gen annotasyon çalışmaları yapılmış ve diziler GenBank veri tabanına kaydedilmiştir. Ayrıca, GH13 enzim familyasına ait oldukları belirlenen tüm bu olası protein dizilerinin filogenetik ve *in siliko* analizleri gerçekleştirilerek, dizilerdeki korunmuş dizi bölgeleri, kataliz ve substrat bağlanması için önemli amino asitler belirlenmiştir. Sonuç olarak; *Anoxybacillus* cinsinin taksonomik revizyonuna önemli katkılar sağlayacak veriler elde edilmiş, özellikle endüstriyel anlamda önemli olabilecek ve yeni projelere materyal oluşturabilecek *Anoxybacillus* cinsi termostabil amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz üreticisi suşlara ait gen kaynakları belirlenerek literatüre kazandırılmıştır. Ayrıca, yüksek termostabil α-amilaz aktivitesi gösteren, endüstriyel işlemlerde kullanım potansiyeline sahip ve biyoteknolojik açıdan önemli olabilecek termofilik basiller elde edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. TERMOFİLİK BASİLLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Mikroorganizmalar optimum üreme sıcaklıklarına göre psikrofiller (< 20°C), mezofiller (20-45°C) ve termofiller (≥ 45°) olmak üzere üç temel gruba ayrılırlar. Sıcak su kaynaklarında ve diğer termal ortamlarda bulunan ve optimum üreme sıcaklığı 45-80°C olan organizmalar termofil olarak adlandırılırlar (2).

Termofiller yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmakla birlikte üremeleri ve hayatta kalabilmeleri için bu tür yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyan organizmalardır. Brock (1978) tarafından tanımlandığı şekliyle; bir termofil, üyesi olduğu taksonomik grup için maksimum sıcaklıklarda üreme kapasitesine sahip bir organizmadır (34-36).

Termofiller, üreme gösterdikleri farklı sıcaklık değerlerine göre üç sınıfa ayrılırlar:

(i) 45-70°C arasında değişen sıcaklıklarda optimum üreme gösteren fakültatif termofiller,

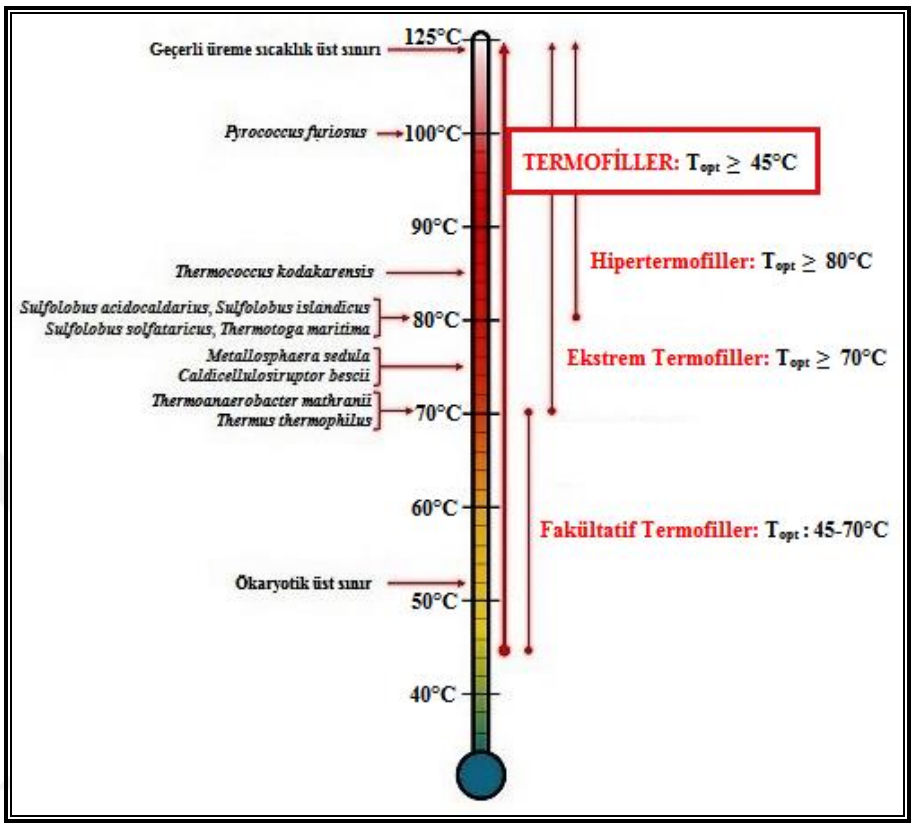
(ii) 70°C ve üstündeki değerlerinde optimum üreme gösteren ekstrem termofiller ve

(iii) 80°C ve üstündeki sıcaklıklarda üreyebilen hipertermofiller (37) (Şekil 2.1).

Termofilik bakteriler, yüksek sıcaklıklardaki karasal ve denizel habitatlardan izole edilmişlerdir. Solfatarik alanlar, hidrotermal kuyular, karasal, yeraltı ve denizel sıcak su kaynakları, petrol rezervuarları gibi çeşitli jeotermal ya da volkanik alanlarda yaygın olarak bulunurlar. Bu çevrelerin yanı sıra topraktan, gübreden, lağım arıtma sistemlerinden, nehir ve göllerden, hava kontaminantlarından ve konservelerden de izole edilebilirler. Evsel ve endüstriyel sıcak su sistemleri ise termofiller için insan yapımı habitatları oluşturur. Bu ekosistemler, yüksek tuz konsantrasyonuna (% 3) ve 5.0-8.5 arasında değişen pH değerlerine sahiptir (38).

Spor oluşturan ve 70°C'de üreme gösteren aerobik, termofilik bakterilerin ilk kez 1888 yılında Miquel tarafından izole edilmesinin ardından, farklı bölgelerden özellikle *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine ait sporlu bakteriler olmak üzere birçok termofilik suş izole edilip karakterize edilmiştir (39). Son yıllarda yapılan taksonomik çalışmalarda, 45-70°C arasındaki sıcaklıklarda optimum üreme gösteren termofilik, endospor üreten bakteriler, *Bacillus* (40, 41), *Sulfobacillus* (42), *Alicyclobacillus* (43), *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*

(44), *Anoxybacillus* (8), *Thermobacillus* (45), *Geobacillus* (46), *Ureibacillus* (47), *Cerasibacillus* (48), *Caldalkalibacillus* (49), *Thermalkalibacillus* (50), *Aeribacillus* (51), *Caldibacillus* (52) ve *Thermolongibacillus* (53) cinsleri içerisinde sınıflandırılmışlardır.



Şekil 2.1. Termofillerin optimum üreme sıcaklık değerleri (37)

Gram-pozitif ya da değişken boyama özelliği gösteren, endospor üreten, aerobik ya da fakültatif anaerobik, çubuk şekilli bakterilerin 16S rRNA gen dizilerindeki çeşitliliğin incelenmesi, bu basillerin filogenetik olarak oldukça heterojen olduklarını ve önemli bir taksonomik revizyona uğramaları gerekliliğini ortaya koymuştur. Daha fazla 16S rRNA gen dizi verisinin elde edilmesi ile *Bacillus* cinsi daha iyi tanımlanmış gruplara ayrılmıştır (54). Firmicutes alemi, *Bacilli* sınıfı, *Bacillales* ordosu içerisinde aerobik ve endospor oluşturan *Bacillus* cinsi ve ilgili bakteri cinslerini içeren yeni isimlendirilmiş familyalar; i) *Bacillaceae* (40), ii) *Alicyclobacillaceae* (43), iii) *Listeriaceae* (55), iv) *Paenibacillaceae* (56), v) *Pasteuriaceae* (57), vi) *Planococcaceae* (58), vii) *Sporolactobacillaceae* (59), viii) *Staphylococcaceae* (60) ve ix) *Thermoactinomycetaceae* (61) şeklinde yeniden sınıflandırılmışlardır (62). Yeni tanımlanan ya da yeniden sınıflandırılan cinsler arasında, termofilik basillerin çoğu 16S rRNA dizilerine göre *Bacillus* cinsi genetik grup 1 ile 5 arasında değerlendirilmektedir (63, 64). Nazina ve arkadaşlarının (2001) yaptığı taksonomik çalışmalar sonucunda en iyi tanımlanmış türlerden biri olan ve daha önce

Bacillus stearothermophilus olarak adlandırılan tür, genetik grup 5 içerisinde yeni *Geobacillus* cinsine dahil *Geobacillus stearothermohilus* türü olarak yeniden adlandırılmıştır (46). Ayrıca, *Anoxybacillus pushchinoensis*'in izole edilmesi ile *Bacillus flavothermus, Anoxybacillus* cinsine dahil olmuş ve *Anoxybacillus flavithermus* olarak yeniden sınıflandırılmıştır (8).

Bacillaceae familyasına ait termofilik bakteriler, filogenetik olarak çeşitlilik gösteren Gram-pozitif ya da değişken Gram-boyama gösteren, endospor üreten, aerobik ya da fakültatif anaerobik, çubuk şekilli bakterilerden oluşmaktadır. Bu ailenin üyeleri, doğada yaygın olarak bulunan ve heterotrofik üreme için çok çeşitli karbon kaynaklarını kullanan ya da ototrofik olarak üreme gösteren termofilik, psikrofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik bakterileri içermektedir (46). *Bacillus* ve ilgili cinsler, ısıya, donmaya ve çeşitli stres faktörlerine karşı oldukça dirençli endosporlar üretirler ve bu durum onların uygun olmayan yaşam koşullarında nasıl dirençli kalabildiklerini göstermektedir. Vejetatif hücre içerisindeki endosporlar, terminal, subterminal ya da sentral olarak yerleşim gösterirler. *Bacillus* cinsinin üyeleri ve zorunlu termofilik basiller genellikle basit besin gereksinimleri gösterirler ve bu nedenle, üreme için spesifik aminoasitlere ihtiyaç duymazlar ve Tryptic Soy Agar (TSA) gibi besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilirler. Termofilik basillerin optimum üreme sıcaklıkları türler ve suşlar arasında farklılık göstermekle birlikte çoğunlukla 50-65°C arasında değişmektedir (65, 66).

Bacillaceae familyası, zorlu endüstriyel işlemlerdeki yüksek pH ve sıcaklık değerlerine dirençli enzimlere sahip olmaları bakımından, endüstriyel biyoteknoloji alanında en fazla ilgi gören termofilik bakteri gruplarını içermektedir (67). Yüksek katalitik aktiviteye sahip olmaları, daha az yan ürün oluşumuna sebep olmaları, düşük maliyetle oldukça yüksek miktarlarda üretilebilmeleri ve zorlu endüstriyel işlemlere dayanıklı enzimlere sahip olmaları nedeniyle, birçok biyoteknolojik alanda kullanılmak üzere özellikle termofilik bakterilerden elde edilen enzimler tercih edilmektedir (68).

2.2. *ANOXYBACILLUS* CİNSİ

2.2.1. *ANOXYBACILLUS* CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Anoxybacillus ("an", "olmaksızın"; "oxy", "oksijen"; "bacillus" "çubuk-şekilli mikroorganizma") cinsi, "üreme için oksijene ihtiyaç duymayan basil" anlamı taşımaktadır. Bu tanıma rağmen, bu cinsin üyeleri aerobik, fakültatif anaerobik veya

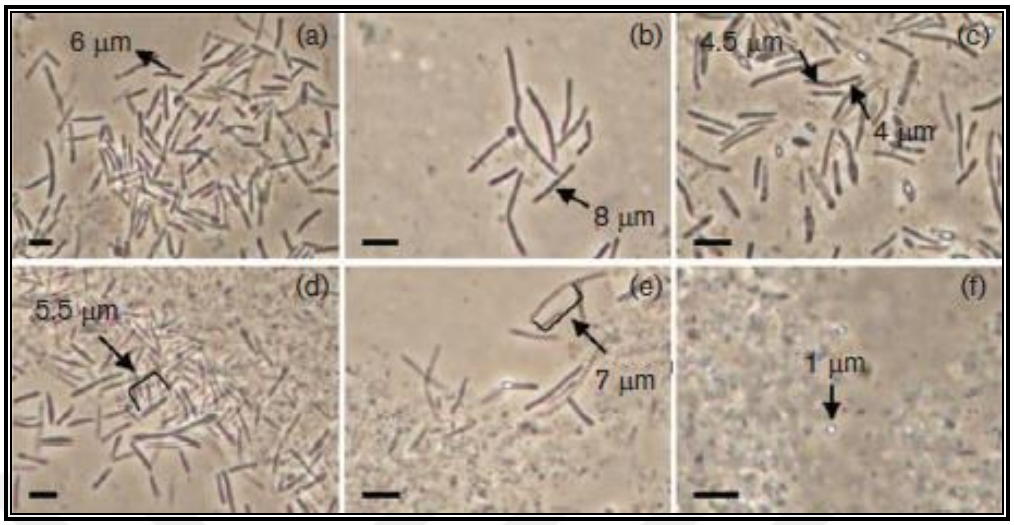
fakültatif aerobik üreme gösterebilmekte, ancak zorunlu anaerobik üreme gösterememektedir (10). Sadece *Anoxybacillus pushchinoensis* türü aerotolerant anaerob olup anaerobik koşulları tercih eder. *Anoxybacillus* cinsinin taksonomik sınıflandırılması Şekil 2.2'de verilmektedir (69).

Şekil 2.2. *Anoxybacillus* cinsinin taksonomik sınıflandırılması (69)

Anoxybacillus cinsinin üyeleri; Gram-pozitif, endospor oluşturan, boyutları 0.4-1.5 x 2.5-9.0 µm arasında değişen, çubuk şekilli (basil formunda), çoğunlukla aerotolerant anaerobik ya da fakültatif anaerobik üreme gösteren termofilik bakteri türlerini içermektedir (67). Çoğu *Anoxybacillus* türünün hücre morfolojisi benzerdir; kıvrık ya da dalgalı hücrelere sahip *Anoxybacillus contaminans* dışında hücreler düz çubuk-şekilli olup, yuvarlak uçlu ve çoğunlukla çiftler ya da kısa zincirler halinde bulunurlar. *A. pushchinoensis* ve *Anoxybacillus kamchatkensis*'in hücreleri, eksponensiyal büyüme fazında köşeli olarak bölünmeye başlamaları nedeniyle Y-şekilli olabilirler. *A. pushchinoensis* ve *Anoxybacillus voinovskiensis* dışında çoğu *Anoxybacillus* türü hareketlidir. Tüm türler terminal, yuvarlak, oval ya da silindirik, ısıya ve donmaya karşı oldukça dirençli sporlara sahiptirler (Şekil 2.3). Gram-boyama özelliği değişken olan *A. contaminans* dışında tüm türler, kalın peptidoglikan tabakalı bir Gram-pozitif hücre duvarı yapısına sahiptirler (10).

37°C'de optimal üreme gösteren TSB-6 suşu hariç, *Anoxybacillus* türlerinin çoğu 50-65°C arasında değişen sıcaklıklarda optimum üreme gösteren fakültatif termofilik basillerdir. *Anoxybacillus* hücreleri alkalifilik ya da alkalitoleranttır ve *Anoxybacillus amylolyticus* (üreme için optimum pH 5.6) dışında, türlerin birçoğu çoğu nötral pH değerlerinde ve karbonat iyonlarına bağımlı olmadan yaşayabilirler (10, 67). Üreme için en yüksek pH değeri *Anoxybacillus suryakundensis* için pH 11.5 olarak gözlenmiştir (70). Tüm

Anoxybacillus türlerinin ortak özelliği, NaCl'den bağımsız olarak üreme göstermeleri ve tuza nispeten düşük direnç göstermeleridir (% 5-6 NaCl üremeyi inhibe eder) (10, 67).



Şekil 2.3. 55°C'de üretilmiş *Anoxybacillus calidus* türüne ait hücrelerin faz-kontrast mikrografisi (a) 6 saatlik genç vejetatif hücreler; (b) 18 saatlik vejetatif ve şişkin olmayan sporangiyumlar içerisinde spor oluşturan hücreler; (c) ve (d) 24 saatlik spor oluşturan hücreler; (e) 48 saatlik spor oluşturan hücreler; (f) 72 saat sonunda oluşan serbest sporlar Bar: 5 µm (71)

Fermentatif ya da oksijenli solunum metabolizmasına sahip kemoorganotrofik özellik gösterirler. Oksidaz ve katalaz reaksiyonları değişkendir. Birçok farklı besiyeri çeşidinin kullanılmış olması, *Anoxybacillus* türlerinin kolayca izole edilebildiğini, üretilebildiğini ve çoğaltılabilmesi için spesifik bir besiyerine ihtiyaç duyulmadığını göstermektedir. Ancak, *A. pushchinoensis* gibi bazı türler zorunlu olarak karbonat bulunan ortamda üreme gösterdiklerinden spesifik karbonat içeren besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. Kullanılan birçok besiyerinde, maya ekstraktı önemli bir organik azot kaynağı olarak bulunmaktadır (10, 67).

Anoxybacillus cinsi, sakkarolitik ve proteolitik türler içerdiklerinden, doğal komünitelerin beslenme zincirinde organik madde dekompozisyonu işlevini yürütürler. *A. flavithermus*, *A. kamchatkensis* ve *Anoxybacillus gonensis*, şeker ve proteolizis ürünlerini (pepton ve maya ekstraktındaki amino asitler) hidrolizleme kapasitesine sahiptirler. *A. pushchinoensis* ve *A. voinovskiensis* türleri ise sakkarolitik olup pepton, kazein, jelatin ya da maya ekstraktı varlığında üreme gösteremezler (10).

Anoxybacillus cinsinin birçok üyesi, çoğunlukla jeotermal sıcak su kaynaklarından izole edilmiştir (72-82). Bunun yanında, gübreden (8, 9), çamurdan (52), jeotermal topraklardan (16, 71) ve kontamine jelatin örneklerinden (83) izole edilmiş türler de mevcuttur.

Anoxybacillus türleri süt ve süt ürünlerinde de bulunmaktadır. Yeni Zelanda, Uruguay ve Çin dahil 20'den fazla ülkeden alınan süt örneklerinde gerçekleştirilen rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA analiz sonuçları, süt içerisinde kontaminasyona neden olan en önemli türlerin *Geobacillus stearothermophilus, A. flavithermus, Bacillus licheniformis* ve *Bacillus subtilis* olduğunu göstermiştir (84-87). *Anoxybacillus*'un süt işleme süreçlerine dirençlilik göstermesinin en az beş olası açıklaması vardır. İlki, bakteriyel endosporlar ısıya dirençlidir ve ısıya dayalı sanitasyon uygulamasını tolere edebilir. İkinci olarak; endospor oluşumunun yanı sıra, *A. flavithermus* ve *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* gibi üyeleri biyofilm üretebilirler ve çeşitli paslanmaz çelik yüzeylere tutunabilirler. Biyofilmleri, spor yapılarını da kapsamakta ve sporlar biyofilm gelişimi ile eş zamanlı olarak hızlı bir şekilde (6-8 saat) oluşmaktadır. Belirli koşullar altında, biyofilmin % 50'si spordan oluşabilir (65). Üçüncü olarak; yüklü ve hidrofobik hücre yüzeyi, *Anoxybacillus*'un paslanmaz çelik yüzeylerine bağlanmasını kolaylaştırmaktadır (88). Paslanmaz çelik yüzeylerindeki biyofilmlerin normal temizleme ve sanitasyon uygulaması ile giderilmesi bu nedenle zor olmaktadır. Dördüncü olarak; son yıllarda *Anoxybacillus* üzerinde düşük ve yüksek sıcaklık koşullarında bir proteomiks çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, yüksek sıcaklıklarda üreyebilen *Anoxybacillus* sp. TSB-6 suşunun, hücresel metabolizma ve protein katlanmasında rol oynayan proteinlerin (özellikle 60 kDa'luk bir şaperon) üretimini regüle ettiğini ortaya koymuştur (89). Bu bulgu, *Anoxybacillus*'un ısıya dayanıklı bir bakteri olduğunu ve sütün sterilizasyon işlemi ile kolayca öldürülemeyeceğini göstermiştir. Son olarak; sıcak su kaynakları *Anoxybacillus* için doğal habitatlardır ve süt ortamı da bu habitatlara eş değer olarak düşünülebilir. Süt içerisinde 2-125 mM arasında değişen konsantrasyonlarda Na^{+}, K^{+}, Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonları bulunmaktadır. Somerton ve arkadaşları (2012), bu katyonların, süt tozu üretim tesislerinden elde edilen *A. flavithermus* DSM 2641, *Geobacillus* sp. F75 ve *G. thermoleovorans* DSM 5336 suşlarının üremeleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Ca^{+2}'un tek başına ya da Mg^{+2} ile birlikte ilave edilmesi ile *A. flavithermus* ve *Geobacillus* sp. F75 suşlarının üremelerinde artış gözlenmiştir (90).

Anoxybacillus cinsine ait türlerin 16S rRNA gen dizileri arasındaki benzerlik oranı % 93.8-99.7 arasında değişmekte olup, filogenetik olarak heterojen bir termofilik basil grubunu temsil ederler (bu çalışma). En yakın akrabaları olan *Geobacillus, Saccharococcus* ve *Aeribacillus* cinsleri *Anoxybacillus*'a % 90-95 arasında dizi benzerliği gösterirken, *Caldalkalibacillus* ve *Calditerricola* daha düşük oranda (% 85-88) dizi benzerliği

göstermektedir (10). Bu cinsin DNA G+C içeriği, türler arasında değişkenlik göstermekte olup, *Anoxybacillus calidus*'da 37.8 % mol (71) iken, *A. gonensis*'te 57 % mol (72) olarak belirlenmiştir. *Anoxybacillus* cinsinin fizyolojisi, metabolizması ve metabolomiksi hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Örneğin, hücrelerin yüksek sıcaklıklarda, pH'ta ve diğer çevresel stres faktörleri altında hayatta kalabilmesine olanak sağlayan biyokimyasal tepkimelerle ilgili çalışmalar henüz tamamlanmamıştır. *Anoxybacillus* cinsine ait protein yapılarının tamamen aydınlatılmasına yönelik çalışmaların da sınırlı olması, onları yapısal mimarilerini anlamak ve diğer benzer proteinlerle karşılaştırmak için yapılacak protein mühendisliği çalışmalarının ilgi odağı haline getirmektedir. Ayrıca, *Anoxybacillus* spp. suşlarına ait gerçekleştirilecek genomik çalışmalar, biyokimyasal yapılarının yanı sıra endüstriyel işlemlerdeki potansiyel uygulanabilirlikleri hakkında bilgi vermesi bakımından önem taşımaktadır (67).

Anoxybacillus spp. suşları arasında, sadece *Anoxybacillus flavithermus* WK1 (BioProject aksesyon numarası, PRJNA59135) (91), *A. gonensis* G2T (PRJNA264351) (92), *Anoxybacillus* sp. B7M1 (PRJNA314079), *Anoxybacillus* sp. B2M1 (PRJNA314078) (93) ve *A. amylolyticus* DSM 15939T (PRJNA315823) (16) suşunun tüm genomu dizilenmiştir. *A. flavithermus* WK1 için elde edilen verilere göre, *Anoxybacillus* kromozomu 3.0 megabazdan küçüktür. *Geobacillus kaustophilus, Geobacillus thermodenitrificans* ve diğer *Bacillus* türlerinde bir veya birden fazla plazmidin bulunduğu belirlenmiş; ancak *A. flavithermus* WK1'de herhangi bir plazmid tanımlanmamıştır (91). Son yıllarda, *A. flavithermus* TNO-09.006 suşunun taslak genom dizisi (PRJNA169174) elde edilmiştir (94). Her iki *A. flavithermus* suşu, sırasıyla Yeni Zelanda ve Hollanda'daki süt ürünleri işletme tesislerinden izole edilmişlerdir. *A. gonensis* $G2^T$ suşu ise Türkiye'deki Gönen kaplıcalarından izole edilmiştir (72). Endonezya'daki bir sıcak su kaynağından izole edilen *A. kamchatkensis* G10 (PRJNA170961) suşuna ait taslak genom dizisi ise 2012 yılında elde edilmiştir (95). Goh ve ark. (2014) tarafından Malezya'daki sıcak su kaynaklarından izole edilmiş iki *Anoxybacillus* sp. SK3-4 (PRJNA174378) ve DT3-1 (PRJNA182115) suşlarının genomları dizilenmiş ve yüksek kalitede iki taslak genom dizisi elde edilmiştir (96). Bunların dışında, GenBank (97) ve Genomes OnLine (GOLD v.6; 98) veri tabanlarında bulunan ve birçoğu son yıllarda elde edilmiş *Anoxybacillus* spp. suşlarına ait diğer taslak genom dizileri, *Anoxybacillus tepidamans* PS2 (PRJNA214279); (52), *A. flavithermus* Kn10/NBRC 109594 (PRJDB1085); (99), *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13T (PRJNA213809); (78, 100), *A. flavithermus* 25 (PRJNA258119); (101), *A.*

flavithermus AK1 (PRJNA190633); (102), *A. ayderensis* AB04T (PRJNA258494); (103), *Anoxybacillus* sp. BCO1 (PRJNA261743); (104, 105), *Anoxybacillus thermarum* AF/04T (PRJNA260786); (106), *Anoxybacillus* sp. ATCC BAA-2555 (PRJNA260743) (93, 107), *A. flavithermus* B4168 (PRJNA270597); (108), *Anoxybacillus* sp. P3H1B (PRJNA305084), *A. pushchinoensis* K1 (PRJNA323217), *A. suryakundensis* DSM 27374T, *Anoxybacillus* sp. KU2-6(11) (PRJNA258246), *A. mongoliensis* MB4 (PRJNA356103), *A. vitaminiphilus* CGMCC 1.8979 (PRJNA370109), *Anoxybacillus* sp. UARK-01 (PRJNA379989) ve *Anoxybacillus* sp. 103 (PRJNA353767) (yayınlanmamış veriler) suşlarına aittir.

Anoxybacillus cinsi, *Bacillaceae* familyasına dahil cinsler arasında en küçük genoma sahip olmakla birlikte, genomlarında ana metabolik azot yolaklarına ait genler yer almaktadır. *Anoxybacillus* spp. türleri, çoğunlukla sıcak su kaynaklarından ve süt içeren ortamlardan izole edilmektedir. Bu çevreler, organik azot bileşikleri bakımından zengin olduğundan *Anoxybacillus* spp. türlerinin birçoğunun genomunda inorganik azot metabolizmasında sorumlu nitrat redüktaz gen komplekslerinin bulunmaması etkili ve enerji-sağlayan bir strateji olarak kabul edilmektedir (96). *Anoxybacillus* genomunun boyutu kısmen küçük; ancak temel ve uygulamalı çalışmalar için yeterince büyüktür. Olası çalışmalardan biri, genomun yeniden yapılandırılması işleminin zorluğunu en az seviyede tutma avantajı sağlaması sebebiyle, *Anoxybacillus*'u bir mikrobiyal hücre fabrikası olarak kullanmaktır. Örneğin; *Anoxybacillus* genomu, bazı termozim uygulamaları için ısıya dayanıklı gen ekspresyon konağı olarak kullanılabilir (67).

2.2.2. *ANOXYBACILLUS* CİNSİNİN TERMAL STABİLİZASYONU

Goh ve ark. (2014) tarafından Malezya'daki iki farklı sıcak su kaynağından izole edilmiş ve 55°C'de optimum üreme gösteren *Anoxybacillus* spp. SK3-4 ve DT3-1 bakterilerinin belirli sıcaklıklara adaptasyonları üzerine çalışmalar yapılmıştır (18). Bu çalışma, literatürde *Anoxybacillus* spp. suşlarının termostabilitesinin moleküler yönden incelendiği tek çalışmadır. DNA'nın *in vivo*'da sekonder yapısını muhafaza edebilmesi genellikle % G+C miktarı ile ilişkilidir. *Anoxybacillus* spp. SK3-4 ve DT3-1 suşlarının DNA % G+C içerikleri sırasıyla % 41.89 ve % 41.46 olarak belirlenmiştir. Buna karşın, ilgili suşların rRNA dizilerinin % G+C içerikleri beklenenden yüksek olmak üzere sırasıyla % 55.80 ve % 56.24 olarak tespit edilmiştir. Aynı suşların tRNA dizileri de sırasıyla % 59.43 ve % 60.03 gibi yüksek oranlarda bulunmuştur. Benzer yaklaşım, *A. flavithermus* WK1, *A.*

flavithermus TNO-09.006 ve *A. kamchatkensis* G10 suşları için de söz konusu olmuştur (96). Trivedi ve arkadaşları tarafından ifade edildiği üzere; termofillerin protein kodlayan genlerinde bu yüksek % G+C oranı arasında herhangi bir tutarlılık söz konusu olmasa da, termofillerde rRNA ve tRNA dizilerindeki % G+C oranının yüksek oluşu, yaşamsal faaliyetleri kodlayan bu önemli genlerin termal bozunmaya karşı korunduğuna işaret etmektedir (109).

Anoxybacillus türlerinin sıcak su kaynaklarında üreyebilmelerinin bir diğer nedeni ise ters giraz enzimine sahip olmalarıdır. *Anoxybacillus* spp. SK3-4 ve DT3-1 suşlarının primozom oluşum proteinini kodlayan bir gene sahip oldukları bulunmuştur. Ters giraz enzimi, mezofillerde bulunmayan, hipertermofilik arkelerde ve bakterilerde ise ortak olarak bulunan ve yüksek sıcaklıklarda DNA'ya pozitif süper sarmal özellik kazandırarak genomun stabilitesini sağlayan tip 1A topoizomeraz enzimidir (109, 110). Bu pozitif süper sarmal yapı, DNA'nın sekonder yapısını stabilize edebilmektedir. Ters giraz enziminin *Anoxybacillus* ya da *Geobacillus* gibi termofiller için neden önemli olduğuna dair kabul görmüş bir açıklama bulunmamaktadır. Bu nedenle, ileride gerçekleştirilecek gen-knockout çalışmalarının yanı sıra biyokimyasal ve fonksiyonel doğrulama analizleri, bu proteinin *Anoxybacillus*'un termal adaptasyonundaki rolü hakkında daha fazla bilgi verebilecektir (111).

Poliaminler, DNA ve RNA'ya bağlanabilen ve onları stabilize edebilen pozitif yüklü bileşiklerdir (112). *Anoxybacillus* spp. SK3-4 ve DT3-1 suşlarının spermidin ve spermin gibi lineer poliaminlerin biyosentez yolaklarına sahip oldukları bilinmektedir. Bu suşların genom yapıları incelendiğinde, spermidin sentetaz ve spermidin transport proteinlerini kodlayan genlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Spermidinin ve sperminin her iki suşun termal adaptasyonuna katkı sağladığı öne sürülmüştür. *Anoxybacillus* spp. SK3-4 ve DT3-1 genomunda, ayrıca agmatin üretiminde rol oynayan agmatinazı kodlayan bir genin varlığı tespit edilmiştir. Spermidinin ve sperminin, 50-65°C'de kültüre edilen *A. flavithermus*, *A. gonensis* ve *A. voinovskiensis* türlerinde temel poliaminler oldukları tespit edilmiştir. Agmatin ayrıca *A. flavithermus* ve *A. voinovskiensis*'te de gözlenmiştir. Bunlara ek olarak, *A. voinovskiensis*'te putresin ve termopentamin poliaminleri bulunmaktadır (113).

Anoxybacillus spp. SK3-4 ve DT3-1 suşlarında histon-benzeri proteinlerin varlığının, genom termal stabilitesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Her iki suş, 90 amino asitlik histon-benzeri bir protein olan DNA-bağlanma proteini HU-alfa'yı kodlayan gene

sahiptir. *Anoxybacillus* spp.'de *hupA* geni tarafından kodlanan proteinin, DNA'yı denatürasyondan ve ekstrem çevre koşullarında parçalanmalara karşı korumak üzere onun paketlenmesinde rol oynadığı öne sürülmektedir (114).

X-ışını kristalografisi ile belirlenmiş birçok protein yapısı, termofillerde yer alan proteinlerin iyonik etkileşimler, hidrojen bağları ve Arg ve Tyr gibi belirli amino asitler bakımından daha zengin olduklarını göstermektedir (115). *Anoxybacillus*'un termostabilitesi ile protein yapısı arasındaki ilişki hakkında net bir bilgi bulunmamaktadır. Ancak, Goh ve ark. (2014), *Anoxybacillus* spp. SK3-4 ve DT3-1 suşlarında genom analizleri gerçekleştirmişler ve bu suşların sıcaklık değişimlerine karşı adaptasyonları konusunda bazı fikirler öne sürmüşlerdir. Bu iki suşun optimum üreme sıcaklığı 55°C olmasına karşın, suşlar suyun sıcaklığının 50-80°C arasında değiştiği bir bölgeden izole edilmişlerdir. Bu nedenle, bu suşların sahip oldukları proteinlerin katlanmasında ya da parçalanmasında ısı şok proteinlerinin önemli rol oynadıkları öne sürülmüştür. *Anoxybacillus* şaperonin genlerinin birçoğu kümeler halinde düzenlenmiştir (96).

Anoxybacillus spp. suşları, 30°C'de nispeten yavaş üreme gösterirler (67). *Anoxybacillus* spp.'nin sıcaklık düşüşüne karşı koyabilmesi için, *Anoxybacillus* spp. SK3-4 ve DT3-1 suşlarında iki soğuk şok proteini (Csps) bulunmuştur (96). Csps'ler, RNA şaperonları olup RNA'nın sekonder yapısının destabilizasyonunda ve muhtemelen transkripsiyon ve translasyonun kolaylaştırılmasında önemli rol oynarlar (116).

2.2.3. *ANOXYBACILLUS* CİNSİNİN BİYOTEKNOLOJİK ÖNEMİ

Anoxybacillus cinsinin ilk kez Pikuta ve ark. (2000) tarafından tanımlanmasının ardından geçen süreçte, bu cinse dahil olan basillerin nişasta ve lignoselülozik biyokütlelerin hidrolizi, çevresel atıkların arıtımı, enzim teknolojisi ve biyoenerji üretimi gibi pek çok alanda kullanılabileceği anlaşılmıştır. Termofilik özellikteki bu bakteriler, pek çok zorlu endüstriyel uygulama için kullanışlı olmakla birlikte, yeni termostabil enzim kaynağı olmaları nedeniyle de sürekli artan bir biyoteknolojik öneme sahiptirler (67). *A. flavithermus* ve *A. amylolyticus*'un α-amilaz (11, 16), *A. mongoliensis*'in proteinaz (117), *A. salavatliensis*'in α-glukozidaz (82), *A. gonensis*'in esteraz (118, 119), aldolaz (120) ve lipaz (121), *A. flavithermus*'un ksilanaz (122) ile selülaz (123) ve *A. pushchinoensis*'in ksilanaz (124) gibi biyoteknolojik öneme sahip bazı termostabil enzim ürettikleri bilinmektedir. Amilaza ek olarak pullulanaz, siklodekstrinaz ve glukoamilaz enzimlerinin

varlığı da gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, 8 farklı besiyerinin *Anoxybacillus* spp. SK3-4 ve DT3-1 suşlarından elde edilen doğal pullulanazın ekspresyonu üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Kültür besiyerine pullulan eklenmesinin pullulanaz üretimini arttırdığı gözlenmiştir (125). Diğer bir çalışmada, *Anoxybacillus* sp. LM14-2 suşundan izole edilen pullulanaz enzimi klonlanmış ve karakterize edilmiştir (126). Başka bir çalışmada ise *Anoxybacillus* sp. SK3-4 suşundan 200 kDa'dan büyük bir amilopullulanaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (127). *A. flavithermus*'tan AfCda13 olarak isimlendirilen siklodekstrinaz enzimi, ilk kez Turner ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (128, 129). Nişasta-işleme endüstrilerinde amilazın kullanımına ek olarak, Poli ve arkadaşları (2006) tarafından *A. amylolyticus*'tan elde edilen α-amilazın mikrobiyal enzimatik testlerde ve biyosensör yapımında kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu amilaz, asidotermofilik *A. amylolyticus* türünden izole edildiği için biyokimyasal özellikleri bahsedilen diğer amilazlardan farklılık göstermektedir (16). Çeşitli *Anoxybacillus* türlerinden saflaştırılmış bazı enzimlerin temel biyokimyasal özellikleri Çizelge 2.1'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Çeşitli *Anoxybacillus* türlerinden saflaştırılmış bazı enzimlerin temel biyokimyasal özellikleri (67)

Enzim	Kaynak	Protein Türü*	Optimum Sıcaklık (ºC)	Optimum pH	Referans
Ksilanaz	*A. pushchinoensis* A8	D	55	6.5	(124)
	Anoxybacillus sp. E2	R	65	7.8	(130)
α-L-Arabinofuranosidaz (AbfAC26Sari)	*A. kestanbolensis* AC26Sari	R	65	5.5	(131)
α-Amilaz	*A. flavithermus* DSM 2641	D	60	5.5-6.0	(11)
	Anoxybacillus sp. TSSC-1	D	80	7.0	(19)
	Anoxybacillus sp. SK3-4	R	60	8.0	(18)
	Anoxybacillus sp. DT3-1	R	60	8.0	(18)
Siklomaltodekstrinaz (*Af*Cda13)	*A. flavithermus*	R	57.5	6.5	(129)
Alüminyum tolerant ATPaz	*A. gonensis* G2	R	73	6.0	(132)
Fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz	*A. gonensis* G2	R	60	8.5	(120)
Karboksiesteraz	*Anoxybacillus* sp. PDF1	R	60-65	8.0	(133)
Esteraz/lipaz	*A. flavithermus* T1	R	60-65	6.5-8.0	(134)
Tip II restriksiyon endonükleaz (*Bfl*I RE)	*A. flavithermus*	D	60	8.0	(135)
L-arabinoz izomeraz (L-AI)	*A. flavithermus*	R	95	10.5	(136)

*R, rekombinant enzim; D, doğal enzim

Anoxybacillus cinsi bakterilerin çevre biyoteknolojisine yönelik bazı uygulamalarda da kullanılma potansiyeli bulunmaktadır. Örneğin; bu termofilik suşlar biyoremediyasyon işlemleri için oldukça uygundurlar. Boya ile kontamine olmuş atık suların sıcaklığı genellikle 40-60°C arasında değiştiğinden, atık sulardan boyaların giderimi için termofilik *Anoxybacillus* bakterilerinin kullanılması mezofilik bakterilere göre avantaj sağlamaktadır (137, 138). İtalya'daki Faccia Bianca (FB) sıcak su kaynağından elde edilen *Anoxybacillus*

spp. suşlarının civa (Hg^{+2}) giderim yeteneğine sahip oldukları (139), *Anoxybacillus* sp. TSB-6 suşunun ise krom (Cr^{+4}) içeren atık suların gideriminde kullanılabileceği gösterilmiştir (89). Ayrıca, *A. calidus* C161ab^T suşunun 70 mM konsantrasyondaki bor elementini tolere edebildiği rapor edilmiştir (71). *Anoxybacillus* suşlarının katı ya da yarı-katı atıkların kompostlama işlemlerinde de kullanılabileceği bildirilmiştir (140).

2.2.4. *ANOXYBACILLUS* TÜRLERİNİN α-AMİLAZ AKTİVİTESİNE YÖNELİK YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR

Endüstriyel uygulamalar için uygun α-amilazların izolasyonu, günümüzde ilgi çekici çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır. Son zamanlarda, yoğun olarak halofilik (141), termofilik (142) ve alkalifilik (143) α-amilazlara ilişkin çalışmalar yapılmaktadır. Termostabil ve alkalitolerant amilazlar, deterjan üretiminin yanı sıra nişasta ve tekstil endüstrisinde özellikle tercih edilen enzimlerdir. *Bacillus* sp. KSM-K38 (144), *B. licheniformis* NH1 (143) ve *B. halodurans* (145) gibi çok sayıda *Bacillus* türünün önemli birer termostabil ve alkalitolerant α-amilaz kaynağı oldukları bilinmektedir.

Bazı *Anoxybacillus* türlerinin de ham nişaşta hidrolizinin yanı sıra, endüstriyel uygulamalar için istenilen özelliklere sahip α-amilaz ürettikleri belirlenmiştir. *Anoxybacillus* cinsi bakterilerden izole edilen amilazlar, termostabil, alkalitolerant ve çeşitli jelatinize nişasta türlerinden yüksek miktarda maltoz açığa çıkarma özellikleri nedeniyle, gıda endüstrisinde maltoz şurubu üretiminde ve deterjan endüstrisinde kullanılabilme potansiyeline sahiptirler. Ancak, *Anoxybacillus* cinsinin henüz 2000'li yıllarda tanımlanmış olması sebebiyle, termofilik ve alkali koşullara dayanıklı *Anoxybacillus* türlerinden α-amilaz izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonuna ilişkin literatürde sınırlı sayıda çalışma yer almaktadır. *Anoxybacillus* türlerinden elde edilmiş α-amilaz enzimlerinin protein dizileri ve enzimatik özellikleri hakkında da sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle, moleküler yapısının ve enzimatik özelliklerinin daha iyi anlaşılması açısından *Anoxybacillus* türlerinde α-amilaz varlığının araştırılması son zamanlarda oldukça önemli bir çalışma alanı haline gelmiştir (18).

Bolton ve ark. (1997) tarafından fakültatif termofilik *Bacillus flavothermus*'tan α-amilaz izole edilmiş ve saflaştırılarak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Enzimin 60°C ve 5.5-6.0 arasında değişen pH aralığında optimum aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *Bacillus flavothermus* α-amilazının kimyasal modifikasyonu sonucunda aktif bölgede gerekli

olduğu öne sürülen bir histidin kökü bulunmuştur (11). Viksø-Nielsen ve arkadaşları (2006), *Anoxybacillus contaminans*'ta ham nişastayı hidrolizleyen dört domainli yeni bir α-amilazın varlığını göstermişlerdir. Klasik nişasta sıvılaştırıcı α-amilazlarla kıyaslandığında, bu dört domainli α-amilazın bir nişasta bağlanma domaini de içerdiği belirlenmiştir. Bu domainin varlığı, enzimin nişastayı jelatinizasyon sıcaklığının altında etkili bir şekilde hidrolizlemesine imkan sağlamıştır. Ayrıca, α-amilaz ile *Aspergillus niger*'in glukoamilazı birleştirilmiş ve bu enzim karışımının, ham nişasta parçalanmasında maltojenik α-amilaz ve *Thermoanaerobacter* siklodekstrin glukanotransferazın (CGTaz) oluşturduğu diğer enzim karışımından daha etkili olduğu gösterilmiştir (146).

Termofilik, alkalitolerant amilazlardan farklı olarak, Poli ve ark. (2006) tarafından *A. amylolyticus* türünün asidotermofilik özellikte bir amilaz üreticisi olduğu belirtilmiştir (16). Türkiye'deki bir sıcak su kaynağından izole edilmiş bir *A. flavithermus* suşu, katı-faz fermentasyonu kullanılarak pirinç kabuklarından α-amilaz üretimi için bir inokulum olarak kullanılmıştır (147). Yapılan bir çalışmada, *A. flavithermus*'dan ham mısır nişastasını parçalayabilen yeni bir α-amilaz (AFA) izole edilmiştir (12). Chai ve ark. (2012) tarafından yürütülen bir araştırmada, Malezya'daki iki farklı sıcak su kaynağından izole edilen *Anoxybacillus* spp. SK3-4 ve DT3-1 suşlarından termostabil ve alkalitolerant özellikte ve nişasta hidrolizi sonucu yüksek oranda maltoz üretebilen ve sırasıyla ASKA ve ADTA olarak adlandırılan iki yeni α-amilaz enziminin ilk kez tüm gen dizileri ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir (18).

Hindistan'daki bir sıcak su kaynağından izole edilmiş termofilik *Anoxybacillus* sp. TSSC-1 suşunun 55°C ve pH 7.0'de monomerik bir amilaz üretme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (19). Diğer bir çalışmada, yine Hindistan'daki bir sıcak su kaynağından izole edilmiş *Anoxybacillus* sp. IB-A suşundan yüksek sıcaklıklara dayanıklı, alkalitolerant ve SDS, EDTA gibi sürfaktan ve şelatlayıcı ajanlara karşı dirençli bir α-amilaz elde edilmiştir (20). Yapılan bir çalışmada, Ağrı ilindeki Diyadin sıcak su kaynağından izole edilen termofilik ve alkalifilik *Anoxybacillus* sp. KP1 suşunun ekstraselüler termostabil α-amilaz üretim kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir (21). Afyonkarahisar ilindeki Ömer Kaplıcalarından izole edilen bir termofilik *A. flavithermus* bakterisinden termostabil ekstraselüler α-amilaz enzimi izole edilmiştir (13).

Mardin ilindeki Dargeçit sıcak su kaynağından izole edilen *Anoxybacillus* sp. AH1 suşundan yeni bir α-amilaz enzimi izole edilip karakterizasyonu gerçekleştirmiştir (22).

Yine *Anoxybacillus* sp. AH1 suşundan çeşitli deterjanlara karşı dayanıklı, termostabil bir α-amilaz elde edilmiş ve saflaştırılmıştır (23). *A. flavithermus* SO-13 izolatının endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek nitelikte olan yeni bir termostabil α-amilazı karakterize edilmiştir (14). Aynı ekip tarafından, sıcak su kaynağından izole edilen *A. flavithermus* SO-19 suşundan termostabil bir α-amilaz enzimi elde edilerek kısmi saflaştırılması yapılmış ve enzimin 70°C'de 30 dakika içerisinde meyve suyundaki nişastanın % 82'sini parçalayabildiği tespit edilmiştir (15). Gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, Çin'deki Tengchong sıcak su kaynaklarından izole edilmiş *Anoxybacillus* sp. YIM 342 suşundan termostabil bir α-amilaz izole edilmiştir. Bu enzimin, çözünür nişastayı glukoz, maltoz ve maltotrioza hidrolizleme yeteneğine sahip olması nedeniyle, biyoyakıt endüstrisine yönelik uygulamalarda kullanılabileceği öne sürülmüştür (24). Ozdemir ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada ise termofilik *A. caldiproteolyticus* D504 ve D621 suşlarının amilaz üretimlerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir (17).

Cihan ve ark. (2012) ve Cihan (2013) tarafından yapılan iki farklı çalışmada, Türkiye'nin farklı jeotermal alanlarından izole edilmiş toplam 115 adet *Bacillaceae* familyasına ait endospor oluşturan termofilik basilin polifazik bir yaklaşımla sınıflandırılmaları sonucunda, bu izolatlar toplam 7 farklı cins altında gruplandırılmıştır. İzolatlardan 53 tanesi *Anoxybacillus cinsine*, diğerleri ise sayıca daha az olarak *Bacillus* (14 izolat), *Brevibacillus* (12 izolat), *Geobacillus* (26 izolat), *Aeribacillus* (4 izolat), *Paenibacillus* (1 izolat) ve *Thermoactinomycetes* (2 izolat) cinslerine dahil edilmiştir. Türkiye'nin jeotermal kaynaklarında, bu izolatlar arasından *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin en yoğun popülasyonu oluşturdukları görülmüştür. Bu çalışmalarda, izole edilmiş 53 *Anoxybacillus* suşundan 51 tanesinin (D392 ve E123 izolatları dışında) ve araştırmada kullanılan *A. kamchatkensis* ve *A. thermarum* tip suşları dışında kalan 11 referans suşun tamamının ise kalitatif olarak α-amilaz üreticisi oldukları tespit edilmiş ve nişasta hidroliz edebilme özelliklerinin, jeotermal alanlarda diğer termofilik endosporlu bakteri cinslerine kıyasla daha yoğun popülasyonlarda bulunmalarını açıklayan bir avantaj oluşturduğu ifade edilmiştir (66, 148).

Bir kısmının bu tez çalışması kapsamında, bir kısmının ise literatürde α-amilaz ürettikleri kalitatif ve/veya kantitatif olarak belirlenmiş olan *Anoxybacillus* türlerinin amilaz üretim yetenekleri Çizelge 2.2'de sunulmuştur.

2.2.5. *ANOXYBACILLUS* CİNSİNE AİT TÜR VE ALT TÜRLERİN TANIMLANMASINA YÖNELİK YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR

Anoxybacillus cinsinin ilk tanımından (8) bu yana, cinse ait 23 adet tür ve 3 adet alt tür tanımlanarak literatüre kazandırılmıştır (149, 150) : *A. pushchinoensis*, *A. flavithermus* (8, 9, 151), *A. gonensis* (72), *A. contaminans* (83), *A. voinovskiensis* (74), *A. kestanbolensis*, *A. ayderensis* (73), *A. kamchatkensis* (152), *A. amylolyticus* (16), *A. rupiensis* (75), *A. bogrovensis* (76), *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (153), *A. thermarum* (77), *A. mongoliensis* (117), *A. eryuanensis*, *A. tengchongensis* (79), *A. salavatliensis* (82), *A. flavithermus* subsp. *flavithermus*, *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* (78), *A. caldiproteolyticus* (52, 154), *A. tepidamans* (52, 155), *A. kaynarcensis* (81), *A. vitaminiphilus* (80), *A. suryakundensis* (70), *A. calidus* (71) ve *A. geothermalis* (93). Bu türlerden *A. suryakundensis* türü ile *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* alt türü sadece bilimsel bir makalede yayınlanmış olup, IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) validasyon listesinde yer almamaktadır (149). Literatürde yer alan tanımlanmış tüm *Anoxybacillus* tür ve alttürleri ile bazı taksonomik özellikleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Anoxybacillus flavithermus, eski adıyla *Bacillus flavothermus* olarak bilinmekteydi. Bu suş, Yeni Zelanda'daki bir kaplıcadan izole edilmiş ve 30-70°C arasında üreme gösteren, sarı pigmentli bir fakültatif anaerob olarak tanımlanmıştır (151). Sonraki yıllarda, Yellowstone Milli Parkı ve Avustralya Büyük Artezyen Havzası'nda *B. flavothermus* suşları ile dizi benzerliği gösteren birçok suş bulunmuştur. 2000 yılından önce, *B. flavothermus* suşları üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıydı. Bu çalışmalar, *B. flavothermus*'un doğal asetat kinaz, miyokinaz, pirüvat kinaz, alanin dehidrojenaz, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz, izositrik dehidrojenaz, ksilanaz ve α-amilazının biyokimyasal karakterizasyonu üzerine yapılmış çalışmaları içermekteydi (67).

2000 yılında, Pikuta ve arkadaşları hayvan gübresinden anaerobik $K1^T$ suşunu izole etmişlerdir. $K1^T$ suşunun 16S rRNA gen dizisi, DNA-DNA hibridizasyon analizleri ve fenotipik özellikleri temel alınarak, *Anoxybacillus*'un *Bacillaceae* familyasına ait yeni bir cins olduğu öne sürülmüştür. *Anoxybacillus* ismi, canlının anaerobik özelliğine dayanılarak verilmiştir. Ortamda çözünmüş oksijenin tükenmesi durumuna anoksik veya anoksi denilmektedir. Dolayısıyla, *Anoxybacillus* oksijensiz ortamda yaşayabilen küçük, çubuk şekilli (basil) mikroorganizmaları tanımlamaktadır. $K1^T$ suşu, bu nedenle *Anoxybacillus*

pushchinoensis olarak adlandırılmıştır. *A. pushchinoensis* K1^T suşu ile *B. flavothermus* filogenetik olarak birlikte ve *Bacillus*'tan ise ayrı bir şekilde kümelenmiş olduklarından, *B. flavothermus*, *Anoxybacillus flavithermus* olarak yeniden isimlendirilmiştir (8).

Pikuta ve ark. (2003), *Anoxybacillus* cinsinin ilk temsilcisi ve tip suşu olan *Anoxybacillus pushchinoensis* K1^T suşunun pH 9.0-9.7'de ANX besiyerinde aerobik olarak da üreyebildiğini göstermişlerdir. Böylece *A. pushchinoensis* türünün ve *Anoxybacillus* cinsinin tanımı yeniden düzenlenmiştir. *A. pushchinoensis*, obligat anaerob yerine aerotolerant anaerob bir bakteri olarak tanımlanırken; *Anoxybacillus* cinsi, obligat anaerob ya da fakültatif anaerob yerine aerotolerant anaerob ya da fakültatif anaerob bir bakteri olarak tanımlanmıştır (9). Sonraki yıllarda, aerobik özellikteki *Anoxybacillus* türleri de tanımlanmıştır (75, 77, 80, 81, 153).

Belduz ve ark. (2003), Balıkesir ilinde yer alan Gönen kaplıcalarından izole ettikleri G2^T tip suşunun morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler taksonomik analizleri sonucunda, Gram-pozitif, fakültatif anaerob, termofilik ve ksilozu kullanarak yüksek ksiloz izomeraz aktivitesi gösteren ve sporlu yapıya sahip, *A. gonensis* olarak adlandırılan yeni bir *Anoxybacillus* türü tanımlamışlardır (72).

De Clerck ve ark. (2004), Fransa'da bir jelatin üretim fabrikasının kontamine jelatin artıklarından izole ettikleri LMG 21881^T tip suşunu, Gram boyama özelliği değişken, sporlu, fakültatif anaerobik ve termofilik özelliklere sahip, *A. contaminans* olarak adlandırılan yeni bir *Anoxybacillus* türü olarak tanımlamışlardır (83).

Yumoto ve ark. (2004), Rusya'nın Kamchatka bölgesinde yer alan bir sıcak su kaynağından (Voinovskie kaplıcaları) fakültatif termofilik, Gram-pozitif, fakültatif aerob, hareketsiz ve çubuk şekilli bir bakteri izole etmişlerdir. 16S rRNA gen dizi analizi, izole edilen TH13^T suşunun *Anoxybacillus* cinsinin yeni bir üyesi olduğunu göstermiştir. DNA-DNA hibridizasyon analizleri sonucunda ise izolat ile filogenetik olarak en yakın ilişkili olduğu *A. pushchinoensis ve A. flavithermus* türleri arasında düşük oranda benzerlik (< % 30.2) olduğu tespit edilmiştir. Fenotipik karakteristikler ve filogenetik verilere dayanılarak, TH13^T suşu yeni bir *Anoxybacillus* türü olarak tanımlanmış ve *A. voinovskiensis* olarak adlandırılmıştır (74).

Çizelge 2.2. Literatürde yer alan tanımlanmış tüm *Anoxybacillus* tür ve alttürleri ile bazı taksonomik özellikleri [Goh ve ark.'nın çalışmasındaki veriler (67) güncellenerek sunulmuştur]

No	Türün Adı	Kaynağı	İzole Edildiği Yer/Bölge	O_2 Metabolizması	α-Amilaz Aktivitesi	Üreme için gerekli				16S rRNA GenBank Aksesyon Numarası	Referans
						T(°C) aralığı	T_{opt} (°C)	pH Aralığı	pH_{opt}		
1	***A. flavithermus* DSM 2641^T**	İsmi bilinmeyen bir sıcak su kaynağı	Yeni Zelanda Kuzey Adası	Fakültatif anaerob	+	30-72	60-65	6.0-9.0	6.0-9.0	CP000922	8, 151
2	***A. pushchinoensis* DSM 12423^T**	Gübre örnekleri	Pushchino Araştırma Merkezi, Rusya	Aerotolerant anaerob	+	37–65	62	8.0-10.5	9.5-9.7	AJ010478	8, 9
3	***A. gonensis* NCIMB 13933^T**	Gönen Kaplıcaları	Balıkesir, Türkiye	Fakültatif anaerob	+	40-70	55-60	6.0-10.0	7.5-8.0	AY122325	72
4	***A. contaminans* DSM 15866^T**	Kontamine jelatin örnekleri	Fransa	Fakültatif anaerob	+	40-60	50	4.5-10.0	7.0	AJ551330	83
5	***A. voinovskiensis* DSM 17075^T**	Voinovskie Kaplıcaları	Kamchatka, Rusya	Fakültatif aerob	+	30-64	54	7.0-8.0	TE	AB110008	74
6	***A. kestanbolensis* NCIMB 13971^T**	Kestanbol Kaplıcaları	Çanakkale, Türkiye	Fakültatif anaerob	+	40-70	50-55	6.0-10.5	7.5-8.5	AY248711	73
7	***A. ayderensis* NCIMB 13972^T**	Ayder Kaplıcaları	Rize, Türkiye	Fakültatif anaerob	+	30-70	50	6.0-11.0	7.5-8.5	AF001963	73
8	***A. kamchatkensis* DSM 14988^T**	Geyser Vadisinde bir sıcak su kaynağı	Kamchatka, Rusya	Fakültatif aerob	zayıf (+)	38-67	60	5.7-9.9	6.8-8.5	AF510985	152
9	***A. amylolyticus* DSM 15939^T**	Jeotermal ısıtmalı toprak	Rittmann Dağı, Antartika	Fakültatif anaerob	+	45-65	61	5.6	TE	AJ618979	16
10	***A. rupiensis* DSM 17127^T**	İsmi bilinmeyen sıcak su kaynakları	Rupi Havzası, Bulgaristan	Aerob	+	35-67	55	5.5-8.5	6.0-6.5	AJ879076	75
11	***A. bogrovensis* DSM 17956^T**	Jeotermal su kaynağı	Dolni Bogrov, Sofya,Bulgaristan	Fakültatif anaerob	+	40-69	65	6.0-10.0	8.0	AM409184	76
12	***A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T**	Taşlıdere Kaplıcası	Batman, Türkiye	Aerob	+	35-65	55	5.5-9.5	7.5	AM999779	153
13	***A. thermarum* DSM 17141^T**	Euganean Kaplıcaları	Abano Terme, Padova, İtalya	Aerob	zayıf (+)	55-67	65	6.0-7.5	7.2	AM402982	77
14	***A. mongoliensis* DSM 19169^T**	Tsenher Kaplıcaları	Moğolistan	Fakültatif anaerob	+	35-70	60	5.5-10.5	8.0	EF654664	117
15	***A. tengchongensis* DSM 23211^T**	İsmi bilinmeyen bir sıcak su kaynağı	Tengchong, Yunnan, Çin	Fakültatif aerob	+	30-75	50	7.0-11.0	8.5	FJ438370	79
16	***A. eryuanensis* DSM 23212^T**	İsmi bilinmeyen bir sıcak su kaynağı	Eryuan, Yunnan, Çin	Fakültatif aerob	+	35-70	55	7.0-11.0	8.0	GQ153549	79
17	***A. salavatliensis* DSM 22626^T**	Yüksek sıcaklıktaki kuyu boru hattı sediment örneği	Salavatlı, Aydın, Türkiye	Fakültatif anaerob	+	37-69	60	5.5-9.5	8.0-9.0	EU326496	82

Çizelge 2.2. (devam) [Goh ve ark.'nın çalışmasındaki veriler (67) güncellenerek sunulmuştur]

No	Türün Adı	Kaynağı	İzole Edildiği Yer/Bölge	O_2 Metabolizması	α-Amilaz Aktivitesi	Üreme için gerekli				16S rRNA GenBank Aksesyon Numarası	Referans
						T(°C) aralığı	T_{opt} (°C)	pH Aralığı	pH_{opt}		
18	***A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T**	İsmi bilinmeyen sıcak su kaynaklarındaki su-sediment örnekleri	Yunnan, Çin	Fakültatif aerob	zayıf (+)	30-66	60	5.5-10.0	7.0-7.5	HM016869	78
19	***A. flavithermus* subsp. *flavithermus* DSM 2641^T**	İsmi bilinmeyen sıcak su kaynaklarındaki su-sediment örnekleri	Yunnan, Çin	Fakültatif aerob	+	30-72	60-65	5.5-9.0	7.0	Z26932	78
20	***A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T**	Su arıtma tesisinden alınan atık su arıtma çamuru	Seletar, Singapur	Aerob	zayıf (+)	37-70	60	5.0-9.0	6.5-7.0	FN428698	52, 154
21	***A. tepidamans* DSM 16325^T**	Jeotermal ısıtmalı toprak	Yellowstone Ulusal Parkı, USA	Fakültatif anaerob	+	40-65	55	6.0-9.0	7.0	FN428691	52, 155
22	***A. kaynarcensis* DSM 21706^T**	Şeker pancarı örnekleri	Leopoldsdorf, Lower Australia	Fakültatif anaerob	+	40-65	55	6.0-9.0	7.0	EU926955	81
23	***A. vitaminiphilus* JCM 16594^T**	Kaynarca Kaplıcaları	İzmir, Türkiye	Aerob	+	35-70	60	6.0-10.0	7.0	FJ474084	80
		Puge Kaplıcası	Puge, Çin	Aerob	+	38–66	57–60	6.0-9.3	7.0-7.5		
24	***A. suryakundensis* DSM 27374^T**	İsmi bilinmeyen bir sıcak su kaynağından alınan sediment örnekleri	Suryakund, Jharkhand, Hindistan	Fakültatif anaerob	+	40-60	55	5.5-11.5	7.5	KC958552	70
25	***A. calidus* DSM 25220^T**	Kızıldere, Sarayköy-Buharkent jeotermal enerji santrali yakınından alınan toprak örnekleri	Denizli, Türkiye	Fakültatif anaerob	zayıf (+)	35-70	55	6.5-9.0	8.0-8.5	FJ430012	71
26	***A. geothermalis* ATCC BAA2555^T**	Jeotermal enerji platformunun zemin üstü filtrelerini tıkayan tortu örnekleri	Groß Schönebeck, Kuzey Almanya	Fakültatif anaerob	+	40-65	60	5.0-9.5	7.0-8.0	KJ722458	93

Dulger ve ark. (2004), Rize'nin Ayder kaplıcaları ile Çanakkale'deki Kestanbol kaplıcalarından alınan çamur ve su örneklerinden iki yeni *Anoxybacillus* türü izole etmişlerdir. İzole edilen AB04^T ve K4^T tip suşları Gram-pozitif, sporlu, fakültatif termofilik ve fakültatif anaerobik üreme gösteren basiller olarak tanımlanmışlar ve sırasıyla *A. ayderensis ve A. kestanbolensis* olarak adlandırılmışlardır (73).

Kevbrin ve ark. (2005), Rusya'nın Kamchatka bölgesinde yer alan Geyser Vadisi'ndeki bir sıcak su kaynağından izole ettikleri JW/VK-KG4^T suşunun morfolojik, fizyolojik ve filogenetik verilerine ve tanımlanmış diğer *Anoxybacillus* türleri ile düşük DNA-DNA homolojisine dayanılarak, Gram-pozitif, sporlu, fakültatif termofilik, fakültatif aerobik ve geniş bir pH aralığında (6.8-8.5) optimum üreme gösteren yeni bir *Anoxybacillus* türü olduğunu tespit etmişler ve bu yeni türü *A. kamchatkensis* olarak adlandırmışlardır (152).

Poli ve ark. (2006), Antartika kıtasında bulunan Rittmann Dağı üzerindeki jeotermal topraklardan termofilik ve yüksek ekstraselüler amilaz aktivitesi gösteren yeni bir bakteri türü izole etmişlerdir. MR3C^T suşu, klasik ve moleküler sistematik analizleri sonucunda, Gram-pozitif, sporlu, termofilik, fakültatif anaerob üreme gösteren, galaktozlu besiyerinde ekzopolisakkarit üreten ve diğer yakın ilişkili türlerde tespit edilmemiş güçlü bir ekstraselüler konstitütif amilolitik aktivite gösteren yeni bir *Anoxybacillus* türü olarak tanımlanmış ve bu tip suş *A. amylolyticus* olarak adlandırılmıştır (16).

Derekova ve ark. (2007), Bulgaristan'ın Rupi Havzası bölgesinde yer alan üç farklı sıcak su kaynağından alınan su ve toprak örneklerinden yeni bir termofilik, aerobik ve amilolitik enzim üreticisi olan hemoorganotrofik bir bakteri izole etmişlerdir. İzole edilen R270^T suşunun filogenetik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri tespit edilmiş ve elde edilen verilere dayanılarak bu suş, *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olarak tanımlanmış ve *A. rupiensis* olarak adlandırılmıştır (75).

Atanassova ve ark. (2008), Bulgaristan'ın Sofya bölgesindeki Dolni Bogrov Köyü yakınlarında yer alan bir jeotermal su kaynağından alınan 56°C sıcaklığında ve pH'sı 8.5 olan bir çamur örneğinden izole ettikleri BT 13^T suşunun fizyolojik, biyokimyasal ve filogenetik özelliklerini incelemişlerdir. Belirlenen genotipik farklılaşma ve farklı fenotipik karakteristiklere dayanılarak, Gram-pozitif, sporlu, fakültatif anaerobik, alkalitolerant ve heterotrofik özellikteki ve intraselüler amilolitik aktivite gösteren bu termofilik basil, yeni

bir *Anoxybacillus* türü olarak sınıflandırılmış ve *A. bogrovensis* olarak adlandırılmıştır (76).

Gul-Guven ve ark. (2008), Batman'da bulunan Taşlıdere kaplıcasından alınan çamurlu su örneklerinden izole ettikleri $KG8^T$ suşunu sporlu, Gram-pozitif, karbon kaynağı olarak galaktoz ve sodyum asetat (zayıf reaksiyon) dışındaki karbohidratları kullanamayan ve aerobik üreme gösteren termofilik basil olarak tanımlamışlardır. $KG8^T$ suşu ile en yakın ilişkili olduğu *A. kamchatkensis* türü arasındaki DNA-DNA hibridizasyon oranının % 67.5 olması nedeniyle, $KG8^T$ suşu *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olarak sınıflandırılamamıştır. Yapılan lipid analizleri ve belirlenen yağ asidi profili, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklere dayanılarak, $KG8^T$ suşu *A. kamchatkensis* türünün yeni bir alt türü olarak tanımlanmış ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* olarak adlandırılmıştır (153).

Poli ve ark. (2009), İtalya'nın Abano Terme bölgesindeki Euganean kaplıcalarından alınan termal çamur örneklerinden izole ettikleri $AF/O4^T$ suşunu, fenotipik özelliklerinin yanı sıra bilinen en yakın ilişkili *Anoxybacillus* türleri ile yapılan DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda, Gram-pozitif, hareketli, sporlu, aerobik ve termofilik özellikte yeni bir *Anoxybacillus* türü olarak sınıflandırmışlar ve bu yeni türü *A. thermarum* olarak adlandırmışlardır (77).

Namsaraev ve ark. (2010), Moğolistan'ın Arkhangai bölgesinde yer alan Tsenher kaplıcalarından (80°C, pH 9.8) alınan su ve termal çamur örneklerinden Gram-pozitif, sporlu ve fakültatif anaerobik üreme gösteren çubuk şekilli bir bakteri izole etmişlerdir. Yaptıkları morfolojik, fizyolojik, filogenetik analizler ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda, $T4^T$ suşunun fakültatif termofilik (T_{opt}, 60 ^{o}C), alkalitolerant (pH_{opt}, 8.0) özellikte, termostabil alkali subtilisin-benzeri serin proteaz enzim üreticisi ve diğer yakın ilişkili türlerde kaydedilmemiş, güçlü bir ekstrasellüler proteolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Diğer *Anoxybacillus* türleri ile düşük DNA-DNA homolojisi gösteren bu suş, yeni bir *Anoxybacillus* türü olarak tanımlanmış ve *A. mongoliensis* olarak adlandırılmıştır (117).

Zhang ve ark. (2011), Çin'in Yunnan şehrindeki Tengchong ve Eryuan bölgesinde yer alan ve sıcaklığı 50°C civarında olan sıcak su kaynaklarından Gram-pozitif, çubuk şekilli, sporlu, fakültatif aerobik, alkalitolerant ve termofilik özellikte iki yeni suş, $T\text{-}11^T$ ve E-

112^T, izole etmişlerdir. Yapılan DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları, fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda, bu iki suşun literatürde mevcut olan diğer *Anoxybacillus* türlerinden genotipik ve fenotipik olarak farklılıklar gösterdiği ve bu nedenle, *Anoxybacillus* cinsine ait iki yeni türü temsil ettikleri sonucuna varmışlardır. T-11^T ve E-112^T suşları, sırasıyla *A. tengchongensis ve A. eryuanensis* olarak isimlendirilmiştir (79).

Cihan ve ark. (2011), Aydın'ın Sultanhisar ilçesine bağlı Salavatlı beldesindeki yüksek sıcaklıktaki kurumuş bir sondaj boru hattından alınan sediment örneğinden yeni bir fakültatif termofilik, Gram-pozitif, çubuk şekilli, sporlu, hareketli, fakültatif anaerobik ve intraselüler α-glukozidaz enzim aktivitesine sahip $A343^T$ suşunu izole etmişlerdir. 16S rRNA gen dizisine dayalı filogenetik analizler sonucunda, $A343^T$ suşunun *Anoxybacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. $A343^T$ suşu ile tanımlanmış *Anoxybacillus* tip suşları arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliğinin % 95.8-99.4 arasında değiştiği görülmüştür. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ile bu suşun en yakın ilişkili olduğu *A. kamchatkensis* ile düşük DNA-DNA homolojisi (% 49.7) gösterdiği ortaya konulmuştur. Fenotipik, filogenetik ve kemotaksonomik verilere dayanılarak, $A343^T$ suşu yeni bir *Anoxybacillus* türü olarak tanımlanmış ve *A. salavatliensis* olarak adlandırılmıştır (82).

Dai ve ark. (2011), Çin'in Yunnan şehrindeki sıcak su kaynaklarından alınan su-sediment örneklerinden termofilik ve etanole dayanıklı yeni bir bakteri türü izole etmişlerdir. İzole edilen $E13^T$ suşunun, yüksek sıcaklıkta % 8 etanol (v/v) içeren ortamda üreyebildiği ve 60°C'de % 13 (v/v) etanol konsantrasyonuna dayanabildiği tespit edilmiştir. Şu ana kadar hiçbir *Anoxybacillus* türünde bu tür bir etanol dirençliliği rapor edilmemiştir. Ayrıca, $E13^T$ suşunun biyofilm üretme yeteneğine sahip olduğu ve bu durumun, yüksek etanol stresi altında hücrelerin üreyebilmesine önemli katkı sağladığı öne sürülmüştür. Fenotipik özelliklere, filogenetik ve DNA-DNA hibridizasyon verilerine dayanılarak; fakültatif aerobik, Gram-pozitif, hareketli ve ksiloz, arabinoz ve sellobiyoz gibi birçok karbon kaynağını kullanabilme yeteneğine sahip sporlu bir basil olarak tanımlanan $E13^T$ suşu, *A. flavithermus*'un yeni bir alt türü olarak sınıflandırılmış ve *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* olarak adlandırılmıştır. *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* alt türünün tanımlanması, otomatik olarak *A.flavithermus* subsp. *flavithermus* alt türünün ortaya çıkmasına neden olmuştur (78).

Chen ve ark. (2004), Singapur'un Seletar bölgesindeki bir su arıtma tesisinden toplanan atık çamurdan Gram-pozitif, aerobik, sporlu, proteolitik aktivite gösteren, termofilik çubuk

şekilli bir bakteri izole etmişlerdir. İzole edilen SF03 suşu, taksonomik ve 16S rRNA analizlerine dayanılarak yeni bir *Geobacillus* türü olarak sınıflandırılmış ve bu türe *Geobacillus caldoproteolyticus* adı verilmiştir (154). Coorevits ve ark. (2012), 62 adet termofilik, aerobik ve endospor oluşturan bakteri suşu üzerinde yapmış oldukları 16S rRNA gen dizi analizi, polar lipid ve yağ asidi analizi, fenotipik karakterizasyon ve DNA-DNA hibridizasyon deneylerini içeren çalışmalar sonucunda, Chen ve ark. (2004) tarafından tanımlanan *Geobacillus caldoproteolyticus* türünü *Anoxybacillus* cinsine ait bir tür olarak yeniden sınıflandırmışlar ve bu türü *A. caldiproteolyticus* olarak adlandırmışlardır (52).

Schäffer ve ark. (2004), farklı coğrafik bölgelerden ve kaynaklardan Gram-pozitif, hareketli, sporlu, fakültatif anaerobik ve fakültatif termofilik özellik gösteren iki bakteri izole etmişlerdir. GS5-97^T suşu, Avustralya'nın Leopoldsdorf bölgesinde yer alan bir şeker pancarı fabrikasından; YNP10 suşu ise ABD, Yellowstone Ulusal Parkından jeotermal olarak ısıtılmış toprak örneklerinden izole edilmiştir. Yapılan fenotipik ve moleküler taksonomik çalışmalar sonucunda, iki izolatın tanımlanmış diğer *Geobacillus* türlerinden ziyade birbirlerine daha fazla benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. 16S rRNA gen dizileri, iki suşun birbirine % 99.8 oranında benzer olduğunu ve DNA-DNA hibridizasyon analizleri ise % 89.9 oranında benzerlik gösterdiklerini ortaya koymuştur. Birçok fenotipik özellik bakımından da benzerlik gösteren bu izolatlardan GS5-97^T tip suşu, yeni bir *Geobacillus* türü olarak sınıflandırılmış ve *Geobacillus tepidamans* olarak adlandırılmıştır (155). Coorevits ve ark. (2012), Schäffer ve ark. (2004) tarafından tanımlanan *G. tepidamans* türünü, *Anoxybacillus* cinsine ait bir tür olarak yeniden sınıflandırmışlar ve bu türü *A. tepidamans* olarak adlandırmışlardır (52).

Inan ve ark. (2013), İzmir'de bulunan Kaynarca kaplıcalarından (60-100ºC) fakültatif termofilik, Gram-pozitif, endospor oluşturan, çubuk şekilli, hareketli, aerobik ve ksilanaz üretme yeteneğine sahip bir bakteri izole etmişlerdir. 16S rRNA gen dizi analizine göre, D1021^T suşunun *Anoxybacillus* türleri ile % 94.7-98.7 arasında benzerlik gösterdiği ve DNA-DNA hibridizasyon değerinin ise % 70'den düşük olduğu tespit edilmiştir. Fenotipik özellikler, rpoB gen dizi analizi, filogenetik ve DNA-DNA hibridizasyon verilerine dayanılarak, D1021^T suşu yeni bir *Anoxybacillus* türü olarak tanımlanmış ve *A. kaynarcensis* olarak adlandırılmıştır (81).

Zhang ve ark. (2013), Çin'in güneybatısındaki jeotermal bir bölgede bulunan Puge kaplıcasından (42-44ºC, pH 7.0) alınan su örneklerinden Gram-pozitif, hareketli, sporlu, aerobik, fakültatif termofilik ve çubuk şekilli 3NP4^T suşunu izole etmişlerdir. 3NP4^T suşu, 38-66ºC'de, 6.0-9.3 aralığındaki pH değerlerinde ve % 0-4 (w/v) tuz konsantrasyonlarında üreme göstermiştir. Yeni izolatın en önemli ayırt edici fizyolojik özelliği, sadece vitamin karışımı ya da maya ekstraktı içeren besiyerinde üreme gösterebilmesidir. 16S rRNA gen dizileri ve DNA-DNA hibridizasyon değerlerine göre, 3NP4^T suşunun *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir türü temsil ettiği sonucuna varılmış ve bu yeni tür *A. vitaminiphilus* olarak adlandırılmıştır (80).

Deep ve ark. (2013), Hindistan'ın Jharkhand, Suryakund bölgesinde yer alan bir sıcak su kaynağından alınan sediment örneklerinden Gram-pozitif, hareketsiz, sporlu, fakültatif anaerob, fakültatif termofilik ve alkalitolerant özelliklere sahip çubuk şekilli bir bakteri izole etmişlerdir. Elde edilen fenotipik, filogenetik ve kemotaksonomik verilere dayanılarak, JS1^T suşu yeni bir *Anoxybacillus* türü olarak tanımlanmış ve *A. suryakundensis* olarak adlandırılmıştır (70).

Cihan ve ark. (2014), Denizli'de yer alan, Kızıldere, Sarayköy-Buharkent jeotermal enerji santrali yakınından alınan toprak örneklerinden termofilik, Gram-pozitif, fakültatif anaerobik, endospor oluşturan, hareketli ve çubuk şekilli C161ab^T suşunu izole etmişlerdir. Türkiye'nin ilk jeotermal enerji santrali olan bu jeotermal bölgedeki su sıcaklığı 195-212ºC arasında olup, toprak bor açısından zengindir (18-29 mg/l). Yapılan fenotipik analizlere dayanılarak, izolatın 35-70ºC (optimum 55ºC) sıcaklık aralığında, 6.5-9.0 (optimum 8.0-8.5) pH değerlerinde ve % 0-2.5 (w/v) tuz konsantrasyonlarında üreyebildiği belirlenmiştir. Termofilik C161ab^T suşunun en önemli ayırt edici özellikleri, 70 mM'a kadar olan bor konsantrasyonunda üreyebilmesi ve DNA G+C içeriğinin, *Anoxybacillus* türleri arasında gözlenen en düşük değer olarak, 37.8 % mol olmasıdır. 16S rRNA gen dizilerine dayanılarak yapılan filogenetik analizler ile C161ab^T suşunun bilinen tüm *Anoxybacillus* türleri ile % 94.6-96.8 oranında dizi benzerliği gösterdiği anlaşılmıştır. Ayrıca, DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ile C161ab^T suşunun, en yakın akraba olduğu *A. rupiensis* (% 21.2) ve *A. voinovskiensis* (% 16.5) türleri ile düşük seviyede benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur. DNA-DNA hibridizasyon değerlerinin yeni bakteri türlerinin ayrımı için önerilen % 70 eşik değerinin (156) oldukça altında olması nedeniyle, C161ab^T suşu *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir tür olarak sınıflandırılmış ve *A. calidus* olarak adlandırılmıştır (71).

Filippidou ve ark. (2016), Kuzey Almanya'nın Groß Schönebeck bölgesindeki bir jeotermal enerji platformunun zemin üstü filtrelerini tıkayan tortu örneklerinden termofilik, Gram-pozitif, sporlu ve fakültatif anaerobik GSsed3^T suşunu izole etmişlerdir. İzolatın 60°C'de, % 0.5 (w/v) tuz konsantrasyonlarında ve 7.0-8.0 aralığındaki pH değerlerinde optimum üreme gösterdiği tespit edilmiştir. DNA-DNA hibridizasyon analizleri sonucunda, ilgili suşun en çok 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdiği *A. rupiensis* DSM 17127^T türüne sadece % 16 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür. Fenotipik, genotipik ve kemotaksonomik karakterizasyon çalışmaları, GSsed3^T suşunun *Anoxybacillus* cinsine ait türlerden farklı olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, GSsed3^T suşunun *Anoxybacillus* cinsine ait yeni bir türü temsil ettiği sonucuna varılmış ve tip türü GSsed3^T olan bu yeni tür *A. geothermalis* olarak adlandırılmıştır (93).

2.3. BAKTERİYEL TAKSONOMİDE TÜR TANIMLAMASI

Bakteriyel türlerin geniş bir filogenetik çerçevede nasıl sınıflandırılması gerektiği genel olarak bilinmesine rağmen, bir türün gerçekte ne olduğuna dair kesin olarak tanımlanmış ve genel kabul görmüş bir kavram henüz bulunmamaktadır. Literatürde, taksonomik çalışmalarda uygulanan 16S rRNA gen dizi analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu gibi genotipik yöntemlerin gelişmesine paralel olarak yapılmış bazı tür tanımları aşağıda verilmektedir (157):

(a) Önemli genotipik, fenotipik ve ekolojik özellikler bakımından benzer gruplardan ayırt edilebilen birbiriyle ilişkili organizmalar grubu (3).

(b) Bir bakteri türü, bakteriyel taksonominin temel birimidir ve grup üyeleri arasında 5ºC ya da daha düşük ΔT_m (ΔT_m; standart koşullar altında oluşturulan homolog ve heterolog hibritler arasındaki erime sıcaklığı farkı) değerine sahip ve % 70 ya da daha yüksek oranda DNA-DNA hibridizasyonu gösteren ve tip suşu içeren suş topluluğu olarak tanımlanmaktadır. Fenotipik özellikler bu tanıma uygunluk göstermelidir (7).

(c) Stackebrandt ve ark. (2002) tarafından yapılan güncel tür tanımına göre; bir bakteriyel tür, önemli ölçüde standardize edilmiş koşullar altında test edilmiş, (birçok) bağımsız özellik bakımından birbirlerine önemli derecede benzerlik gösteren ve ayırt edici bir fenotipik özellik ile teşhis edilebilen monofiletik ve genomik (tercihen) olarak uyumlu bir izolat ya da suş topluluğundan oluşan bir taksonomik gruptur. Fenotipik ve kemotaksonomik özellikler bu tanıma uygunluk göstermelidir (156).

Bir mikroorganizmanın belirli bir türün üyesi olabilmesi, temel olarak standart koşullar altında gerçekleştirilen deneylerde, DNA-DNA hibridizasyon oranlarının % 70'in üzerinde olmasına ve DNA'nın erime sıcaklığının (ΔT_m) 5ºC'den düşük olmasına bağlıdır (7). Bir türün tüm suşları benzer fenotipik özellikler göstermelidir. Bir türün tanımlanması, birden fazla tip suşun özelliklerine dayanılarak yapılmalıdır. İki ayrı mikroorganizmaya ait 16S rRNA dizilerinin birbirlerine ≤ % 99.0 ya da ≤ % 97.0 oranlarında benzerlik göstermesi, bunların farklı türlere ait olduklarına işaret etmektedir (158, 159). 16S rRNA dizilerinde, özellikle % 97.0 gibi bu derecede önemli bir farklılık, % 70'den az DNA-DNA benzerliğini göstereceğinden, bu durumda DNA-DNA hibridizasyon deneylerine gerek duyulmadan da izolatların farklı türlere ait olduklarına karar verilebilir (6).

Günümüzde, yeni bakteri türlerinin tanımlanması; fenotipik (örn. biyokimyasal testler), kemotaksonomik (örn. yağ asit kompozisyonu) ve genotipik (örn.16S rRNA gen dizi analizi) özelliklerin (Çizelge 2.3) (54) bir arada ele alınıp incelendiği polifazik yaklaşıma dayanmaktadır (1, 3, 4, 160). Yeni bir türün tanımlanması için gerekli iki temel koşul; saf kültür şeklinde izole edilmiş suşların kullanılması ve incelenecek karakterlerin (özellikle fenotipik karakterler), mümkün olduğunca standart koşullar altında, referans materyalleri ile birlikte karşılaştırmalı olarak test edilmesidir (156, 161).

Yeni bakteriyel türlerin tanımlanmasına yönelik taksonomik çalışmalarda, yeterli sayıda referans 16S rRNA gen dizisinin kullanılması oldukça önemlidir. Bu bağlamda, yeni türler uluslararası iki kültür koleksiyonunda muhafaza edilmesi zorunlu olan kendi tip suşları tarafından temsil edilmekte ve bu tip suşlar taksonomik çalışmalarda referans materyali olarak kullanılmaktadır (4). Yeni bir bakteri cinsinin veya türünün resmi olarak adlandırılabilmesi için, izolatın detaylı bir tanımlaması ile birlikte önerilen ismi yayınlanmalı ve mikroorganizmanın canlı kültürü, uluslararası iki kültür koleksiyonuna gönderilmelidir (2). Bu amaçla, yeni izole edilmiş bir bakteriyel izolatın taksonomik olarak sınıflandırılması ve türlerinin tam olarak teşhis edilebilmesi için; kültürel, morfolojik, fizyolojik ve besinsel özellikler gibi fenotipik özelliklerinin yanı sıra hücre membranındaki yağ asitleri, kinon ve polar lipid yapıları, hücre duvarındaki peptidoglikan yapısının içeriği, 16S rRNA gen dizileri, genomik DNA'nın % G+C içeriği ve gerekli görüldüğü durumlarda, DNA-DNA hibridizasyon oranları gibi kemotaksonomik ve genotipik özelliklerinin de belirlenmesi gerekmektedir (4, 54).

Çizelge 2.3. Aerobik endospor oluşturan bakterilerin yeni taksonlarının tanımlanmasında kullanılan standart özellikler (54)

TEMEL ÖZELLİKLER	İNCELENMESİ ÖNERİLEN ÖZELLİKLER
MİKROSKOBİK MORFOLOJİ	
Hücre boyutu (genişlik ve uzunluk), genel şekli, zincir oluşturmaları, filamentler	
Genç hücre kültürünün Gram boyama reaksiyonu	
Hareketlilik	Flagel tipi (flagel boyama ya da elektron mikroskopik inceleme)
Depo inklüzyon cisimciklerinin varlığı	
Sporangial morfoloji	
Spor şekli ve pozisyonu	
Şişkin sporangium yapısı	
Parasporal yapıların ya da ekstraselüler veziküllerin varlığı	
Sporangium yapılarının fotomikrografisi	
MAKROSKOBİK MORFOLOJİ	
Kullanılan üreme besiyeri	
Kültür koşulları (sıcaklık, pH, tuza tolerans, inkübasyon süresi)	
Koloni çapı (belli süre inkübasyon sonrası belirlenen)	
Koloni şekli, tümseklik gösterme özelliği, yayılma eğilimi ya da koloniyal hareketlilik, kenar morfolojisi, yüzey dokusu, rengi, besiyeri ortamına tutunma özelliği	
FİZYOLOJİK ÖZELLİKLER	
Tercih edilen üreme besiyeri	
Üreme için optimum, maksimum ve minimum sıcaklık değerleri	
Üreme için optimum, maksimum ve minimum pH değerleri	
Oksijen gereksinimi*	
Tuza tolerans ya da gereksinim (minimum, optimum ve maksimum konsantrasyonlar) ya da tuzlu ortamda üremenin artırılması	
Katalaz aktivitesi	
Oksidaz aktivitesi	
Özel besin ihtiyaçları	Minimal besiyerinde üreme yeteneği
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER	
D-Glukozdan asit üretimi	D-Glukozdan gaz üretimi
	L-Arabinoz, D-mannitol, D-ksiloz ve diğer karbohidratlardan asit üretimi**
	Voges-Proskauer testi

Çizelge 2.3. (devam) (54)

BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER	
Kazein, jelatin ve nişasta hidrolizi	Eskülin ve üre hidrolizi
	Nitrat indirgenmesi ve nitrat ya da nitritin nitröz oksite ya da azot gazına indirgenmesi
	Arginin dihidrolaz reaksiyonu
Sitrat kullanımı	Tek karbon kaynağı olarak propiyonat ve diğer organik asitlerin kullanımı
	Tek karbon kaynağı olarak amino asitlerin kullanımı
	Tek karbon kaynağı olarak karbohidratların kullanımı
	Lesitinaz reaksiyonu***
	Triptofandan indol üretimi
	ONPG (o-nitrofenil β-D-galaktopiranozid) hidrolizi
KEMOTAKSONOMİK ÖZELLİKLER	
Yağ asidi profili	Murein yapısı § Polar lipid analizi§ Kinon analizi§
Hücre duvarı diamino asit içeriği	
NÜKLEİK ASİTE DAYALI MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR	
16S rRNA gen dizi analizi (> 1400 nükleotid, < % 0.5 belirsizlik) ve filogenetik analiz	Protein kodlayan housekeeping genlere dayalı filogenetik analiz
	DNA'nın % G+C içeriği§
Yakın ilişkili türlerin DNA-DNA hibridizasyon analizi #	Hibrit DNA'nın ΔT_m değeri

* Organizma zorunlu aerobik, mikroaerofilik, fakültatif anaerobik ya da zorunlu anaerobik midir? Sadece "aerobik" olarak tanımlanması yeterli değildir.
** Pozitif reaksiyon veren bir karbohidrat fermentasyon testinin bir asit oluşum testi ile eşdeğer tutulmaması gerekmektedir. Birçok mikroorganizma karbohidrat metabolizması sonucunda asit üretemeyebilir.
*** Bu karakter, özellikle *B. cereus* grubu bakteriler için önemlidir.
§ Yeni bir cinsin tanımlanması için gerekli olarak kabul edilen özelliklerdir.
# Yeni suşların 16S rRNA gen dizilerinin mevcut tip şuşlarına % 97 ve daha fazla oranda benzerlik göstermesi durumunda gereklidir.

2.3.1. FENOTİPİK ÖZELLİKLER

Bakteriyel taksonomi, klasik anlamda fenotipik özelliklerin belirlenmesine dayanmaktadır. Bir mikroorganizmanın fenotipi tipik olarak; koloni morfolojisi (renk, şekil, pigmentasyon, slime üretimi, vb.), hücre şekli, boyutu, Gram boyama özelliği, kapsülü, endospor ve inklüzyon cisimciklerinin varlığı, flagella varlığı ve konumu, hareketliliği gibi morfolojik özelliklerinin yanı sıra biyokimyasal testler, farklı sıcaklık, pH, tuz aralıklarında ve atmosferik koşullarda, antimikrobiyal ajanların, farklı karbon ve azot kaynaklarının varlığında üremesi, çeşitli enzimlerin üretimi gibi biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi ile ortaya konulmaktadır (162).

Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin incelenmesi, bakteri türlerinin tanımlanması ve sınıflandırılması için kullanılan en eski yöntemlerdir. Tür ve alt tür seviyesindeki tanımlamalarda, hangi özelliğin stabil ve hangisinin değişken olduğuna karar verilebilmesi için, eğer varsa mutlaka bu grupları temsil eden birden fazla suş incelemeye dahil edilmelidir (4). Fenotipik verilerin elde edilmesinde mümkün olduğunca standardize edilmiş yöntemlerin kullanılması ve deneylerin referans materyalleri ile birlikte paralel yürütülmesi gerekmektedir (161).

2.3.1.1. Mikroskobik Morfoloji

Bir mikroorganizmanın teşhisi sırasında vejetatif hücrelerin büyüklüğü, şekli, zincir oluşturabilmeleri, filament oluşumları, varsa spor yapıları ve hareket yetenekleri (bazı mikroorganizmalar, preparat hazırlama aşamasında flagellerini kaybettiklerinden hareket özelliğinin her zaman mikroskop ile incelenmesi mümkün olmayabilir ve bunun yerine motility agar kullanılabilir) aydınlık alan mikroskobundan çok daha ayrıntılı ve yüksek rezolüsyonda inceleme imkanı sağlayan faz kontrast mikroskopta 1000X'lik büyütme kullanılarak incelenmelidir. Hücre morfolojisinin incelenmesi için 18-24 saat sıvı besiyerinde çalkalamalı olarak üretilmiş kültürlerden alınan örnekler kullanılmalıdır. Endospor oluşturan mikroorganizmalarda, sporların vejetatif hücre içindeki pozisyonu (terminal, subterminal ve sentral) ve vejetatif hücreye göre boyutu, şekli (küresel, silindirik, oval, elipsoidal), parasporal yapıların (pozitif kontrol olarak *Bacillus thuringiensis*'in tip suşu kullanılabilir) ve şişkin sporangium yapılarının varlığı belirlenmelidir. Ayrıca, spor morfolojisini gösteren bir faz-kontrast mikrografisi ile sporülasyon koşullarının detaylarının verilmesi önerilmektedir. Flagella lokalizasyonu

(polar, subpolar ya da lateral) tespit edilmelidir. Flagellanın fiksasyon sırasında kaybolma olasılığına karşın, şuşlar elektron mikroskobunda incelenmeden önce standart testlerle (flagella boyama) ya da ışık mikroskobu altında incelenerek hareketli olup olmadıkları gözlenmelidir. Hücre duvarı kompozisyonu analiz edilse bile Gram reaksiyonu ile önemli tanısal sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu nedenle, öncelikli olarak hücrelerin Gram reaksiyonları gerçekleştirilmelidir. Gram boyama, prokaryot hücrelerinin boyanmasında kullanılan en eski yöntemlerden biri olup, boya kompleksi sayesinde hücre-duvar yapılarının ayırt edilmesi sağlanır (4, 54).

2.3.1.2. Makroskobik Morfoloji

Tür içerisinde ve türler arasında çok geniş koloni morfolojisi çeşitliliği bulunmaktadır. Besiyeri içeriği ve inkübasyon koşulları, hücrelerin morfolojik yapılarını etkileyeceği için uygulanan kültür koşulları da ayrıca belirtilmelidir. Koloni tanımlamalarında; koloninin çapı, genel görünümü, tümseklik gösterme özelliği, yayılma eğilimi ya da koloniyal hareketlilik yeteneği, kenar morfolojisi, yüzey dokusu (örn. parlak ya da mat), rengi, besiyerine tutunma ve hemoliz gösterme özellikleri incelenebilmektedir (54).

2.3.1.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikler

Özellikle yeni bir taksonun tanımlanmasında geleneksel olarak kullanılan fizyolojik ve biyokimyasal karakterlerin mutlaka incelenmesi gerekmektedir. Bunun için rutin olarak uygulanan testler, bazı substratların kullanımının ya da bazı enzimatik ya da fizyolojik aktivitelerin değerlendirilmesine yönelik laboratuvar ortamında hazırlanan besiyerleri ya da ticari kitler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Özellikle *Bacillus* cinsi bakterilerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan ticari kit ya da sistemler, API 20E ve 50CH sistemleri ile VITEK sistemleridir. Bu ticari sistemlerin içeriğinde yer alan besiyerleri laboratuvar ortamında da hazırlanabilir. Ancak, laboratuvarda hazırlanan besiyerleri kullanılarak elde edilen test sonuçları birbirinden farklı sonuçlar verebilir. Bu nedenle, laboratuvarlar arasındaki farklılıkların en aza indirilebilmesi için ticari kitlerin kullanılması daha uygundur. Tüm karakterizasyon testleri için uygulanacak her bir yöntemin detayı mutlaka verilmeli ve sonuçların doğruluğu pozitif ve/veya negatif kontrol olarak referans suşlar kullanılarak kontrol edilmelidir (54, 161).

2.3.2. KEMOTAKSONOMİK ÖZELLİKLER

Hücrenin kemotaksonomik karakterizasyonu; hücre duvarı (diamino asit içeriği, teikoik asit ve mikolik asit varlığı vb.), hücre membran(lar)ı (yağ asiti metil ester ve polar lipid analizleri, kinon içeriği, pigmentler, vb.), sitoplazma bileşenleri (poliamin profili) ve toplam hücre protein profillerinin SDS-PAGE analizi gibi hücrenin çeşitli yapısal elemanlarının incelenmesini kapsamaktadır (4). Günümüzde, MALDI-TOF-MS, FT-ICR MS ve Raman spektrometresi gibi farklı hücresel bileşenlerin analiz edildiği ve bakterilerin rutin kemotaksonomik karakterizasyonu sırasında etkin olarak kullanılabilecek ayrım gücü yüksek bazı yöntemler de bulunmaktadır (158).

2.3.2.1. Hücre Duvarındaki Peptidoglikan Yapısının İncelenmesi

Murein tabakası olarak da bilinen peptidoglikan yapısı, Gram-negatif bakterilerde genellikle tek tip iken, Gram-pozitif bakterilerde oldukça çeşitlilik göstermektedir. Bu nedenle, peptidoglikan yapısı Gram-pozitif bakterilerin tanımlanmasında önemli bir ayırt edici kriterdir. Peptidoglikan, peptitler ile çapraz bağlanmış glikan iplikçiklerinden oluşan bir heteropolimerdir. Glikan omurgası, β-1,4-glikozidik bağlarla bağlı N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit birimlerinden oluşur. Glikan iplikleri içerisinde taksonomik açıdan önem taşıyan tek varyasyon, N-asetilin muramik asit köklerinin N-glikolil grupları ile kısmen yer değiştirmesidir. Peptidoglikan yapısında N-glikolil gruplarının varlığı bakteri cinslerinin tanımlanmasında önemli bir kriterdir (163).

Aerobik, endospor oluşturan bakterilerin bir kısmında bulunmakla birlikte, bu yapı sadece bazı laboratuvarlar tarafından analiz edilebilmektedir. En basit analiz yöntemi, çapraz-bağlı peptit içerisindeki karakteristik diamino asitin belirlenmesidir (4). Bakteri hücrelerindeki 2,6-diaminopimelik asit (Dpm) ve 2,6-diamino-3-hidroksipimelik asit (OH-Dpm) izomerlerinin ve glikan omurgasındaki glikolil köklerinin varlığı bakterilerin sınıflandırılması ve tanımlanması için önemli bilgiler sağlamaktadır (163). Peptidoglikan tipinin (A ya da B), yapısındaki tüm amino asit kompozisyonu, amino asit sırası ve çapraz-bağın şeklinin (doğrudan ya da interpeptid köprüleri aracılığıyla ve köprüdeki amino asitlerle bağlı olup olması) analizi ile daha detaylı bilgi sağlanmaktadır. Çapraz bağlanma biçimi, bir tür içinde ve ayrıca suşlar arasında bile değişkenlik gösterirken, amino asit kompozisyonu bir cinsin tüm türleri için ortaktır (162).

Yeni Gram-pozitif bakteri cinslerinin tanımlanması için peptidoglikan yapısının analizi zorunludur. Amino asit içeriği bilgisi cins tanımında karakteristik özellik olarak verilmelidir. Tanımlanan her yeni Gram-pozitif tür için de amino asit içeriği belirlenmelidir. Ayrıca, interpeptid köprü içeriğindeki farklılıklar, yeni türün diğer türlerden ayırt edilmesine imkan sağlayabilir. Şu ana kadar, *Bacillaceae* familyası üyelerinde mezo-diaminopimelik asit, ornitin ve lizin olmak üzere üç farklı diamino asit tespit edilmiştir (4, 54).

2.3.2.2. Hücre Membran Yapısının İncelenmesi

2.3.2.2.1. Yağ Asitleri ve Türevleri

Bakterilerin yağ asiti içerikleri; zincir uzunluğu, çift bağ, halka yapısı, dallanmış zincirler veya hidroksil gruplar içerip içermemesi gibi özellikler bakımından türden türe oldukça çeşitlilik göstermektedir. Bu nedenle, yağ asiti profili genellikle belirli bir bakteri türününün teşhis edilmesinde kullanılan yardımcı bir analizdir (2). Yağ asidi metil ester (FAME) analizi, mikroorganizmaların tanılanması amacıyla ticari bir veri tabanına bağlı tek kemotaksonomik teknik olarak kullanılmakta ve sıkı standardizasyon koşullarına ihtiyaç duymaktadır. Diğer pek çok fenotipik özellikte olduğu gibi, bir mikroorganizmanın yağ asiti profili sıcaklık, büyüme fazı (logaritmiğe karşı durağan) ve üreme besiyeri gibi kültür koşullarına göre değişkenlik gösterebilir. Bu nedenle, veri tabanındaki mikroorganizmaların yağ asiti içerikleri ile karşılaştırma yapılırken güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için, bilinmeyen mikroorganizmanın veri tabanındaki bu mikroorganizmalarla aynı koşullarda, yani belirli bir besiyerinde ve belirli sıcaklıklarda üretilmesi gerekmektedir. Yakın ilişkili taksonlar için rapor edilmiş kültür koşullarından en uygun olanı sağlanmalı ya da deneylerin referans materyal ile paralel olarak yürütülmesi gerekmektedir (4, 54, 161).

Yağ asitleri belirlenirken, yapısında % 1 ya da daha fazla yağ asidi içeren tüm bileşenler bildirilmelidir. Yağ asidi profilleri karşılaştırılırken, bunların aynı taksonomik grup içerisinde genellikle belirgin değişiklikler göstermeyeceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, düz zincirli ve doymamış yağ asitlerinin sentezlendiği bir grupta dallanmış zincirli yağ asitlerinin varlığı da kaydedilmelidir. Benzer şekilde, hidroksillenmiş yağ asitlerinin varlığı ya da yokluğu genellikle karakteristiktir (4).

2.3.2.2.2. Polar Lipidler

Günümüzde, bakterilerin hücre membranlarında fosfolipidler, glikolipidler, fosfoglikolipidler, aminofosfolipidler gibi polar lipid türlerinin yanı sıra amino asit kökenli lipidler, kapninler, sfingolipidler (glikol ya da fosfosfingolipidler) ve hopanoidler olmak üzere çok çeşitli polar lipid yapılarının yer aldığı bilinmektedir. Polar lipidlerdeki fonksiyonel grupların tanımlanması için uygun boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu geniş çeşitlilik nedeniyle, uygun bir reaktif boya ile boyanmış ince tabaka görüntüsüyle varlığı tespit edilebilen tüm lipid yapıları kaydedilmelidir. Polar lipidlerin taksonomik önemi, *Cohnella, Ornithinibacillus* ve *Viridibacillus* gibi *Bacillaceae* ve *Paenibacillaceae* familyası içerisinde yer alan bazı yeni cinslerde gösterilmiştir. Bu nedenle, yeni bakteri cinslerinin tanımlanmasında polar lipid içeriğinin belirlenmesi zorunlu olmakla birlikte, yeni tür karakterizasyonunda bu yapıların incelenmesi önerilmektedir (4, 54).

2.3.2.2.3. Kinon Yapıları

İzoprenoid kinonlar, bakterilerin sitoplazmik zarlarında bulunan önemli bileşik gruplarıdır. Bu bileşikler, hidrofilik bir baş grubu ile apolar bir izoprenoid yan zincirinden oluşurlar ve lipitte çözünebilen bir yapıya sahiptirler. İzoprenoid kinonlar, temel olarak fotosentez ve solunumdaki elektron taşıma zincirlerinde elektron ve proton taşıyıcıları olarak görev yapmakla birlikte, antioksidan fonksiyonu gibi ilave görevlerde de bulunabilirler. Naftakinonlar (filokinon ve menakinon alt-tipleri ile birlikte) ve benzokinonlar (ubikinonlar, rodokinonlar ve plastokinonlar) temel izoprenoid kinon tipleridir (164).

Farklı izoprenoid grupların, bakterilerin farklı taksonomik gruplarında yer alması, izoprenoid kinon profilini faydalı bir taksonomik araç haline getirmiştir. İzoprenoid kinonların hidrofobik yan zincirleri, sadece uzunluk (5-15 izoprenoid birimi) bakımından değil, aynı zamanda doygunluk derecesi, pozisyonu ve ilave grupların varlığı bakımından da değişkenlik gösterebilir. Yan zincirlerdeki bu çeşitlilik taksonomik öneme sahiptir ve birçok bakteri gruplarının cins ve tür seviyesinde tanımlanmasına yardımcı olmaktadır (165).

Hücresel kinon içeriğinin analizi, yeni bakteri cinslerinin tanımlanmasında önemli bilgi sağlamaktadır. Ancak, yeni türlerin teşhisinde bu yapıların incelenmesi zorunlu olmamakla birlikte analiz edilmesi önerilmektedir. *Bacillaceae* familyası üyelerinde şu ana kadar tespit edilen naftakinon (menakinon) yapıları MK-7, MK-8 ve MK-9'dur (54).

2.3.2.3. Diğer Tanılayıcı Yöntemler

Tür ya da suşlar arasında karşılaştırma amaçlı olarak daha az kullanılan diğer tanılayıcı yöntemler aşağıda verilmektedir:

a. Proteinlerin hücrelerden ekstrakte edilerek SDS-PAGE tekniği ile analiz edildiği tüm hücre protein analizleri, bakteri suşlarının kaşılaştırılmasına yardımcı olabilir ve aynı zamanda DNA-DNA hibridizasyon sonuçları ile uyum göstermektedir. Ancak, protein bantlarının kimlikleri bilinmediğinden bu tekniğin yağ asiti analizi ile ilişkilendirilememesi tekniğin bir dezavantajıdır.

b. Poliaminler, sitoplazmada yer alan, DNA'nın kararlılığını sağlayan ve hücrenin ozmolaritesini koruyan bir bileşik grubudur. Tür ve cins üstü seviyede tanımlama yapmak için kullanılırlar.

c. Sitokromlar, sitoplazmik membran ile ilişkili olup solunum ve fotosentezde elektron transferinde rol oynarlar. Proteine bağlı bir hem prostetik grubu içeren 'hem' proteinlerdir. Farklı sitokrom tiplerinin sınırlı sayıda olması nedeniyle teşhiste tek bir kriter olarak kullanılamazlar (162).

2.3.3. GENOTİPİK ÖZELLİKLER

Genotipler arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde; 16S rRNA gen dizi analizi, genomik DNA'nın % G+C içeriği, ITS-PCR, genomik parmak izi teknikleri ve DNA-DNA hibridizasyonu (DDH) yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (4).

2.3.3.1. 16S rRNA Gen Dizi Analizi

16S rRNA geni; (i) yaygın dağılım göstermesi, (ii) fonksiyonel olarak kararlı, (iii) evrimsel olarak oldukça korunmuş, (iv) evrimsel ilişkilere derin bakış açısı sağlayacak kadar yeterli uzunlukta olması ve (v) yatay gen transferlerine çok fazla maruz kalmaması nedeniyle mikroorganizmalar arasındaki taksonomik ilişkilerin belirlenmesinde iyi bir taksonomik belirteç olarak kullanılmaktadır (2). 16S rRNA molekülü değişken ve korunmuş bölgeler içerir. Tüm 16S rRNA gen dizisinin çoğaltılması amacıyla kullanılacak evrensel primerler, korunmuş bölgeye göre seçilmekte, değişken bölge ise kıyaslamalı taksonomik çalışmalar için kullanılmaktadır (166). 16S rRNA gen dizileri, modern bakteriyel taksonominin filogenetik temelini oluşturmaktadır. Bu nedenle, yeni bir türün tip suşuna ait 16S rRNA

gen dizisinin (> 1400 bç) mutlaka herkese açık bir veri tabanında saklanması, ilgili veri tabanında bulunan ve geçerli bir isim ile yayınlanmış yakın ilişkili diğer tip suşların ve izolatların gen dizileri ile karşılaştırılarak dizi benzerliklerinin belirlenmesi gerekmektedir (54, 167).

Stackebrandt ve Goebel (1994), yeni bakteri türlerinin tanımlanmasında; iki suşun 16S rRNA gen dizi benzerliğinin % 97.0'den az olması durumunda, bu iki suşun farklı türlere ait olabileceğini öne sürmüşlerdir (5). Literatürde % 97.0'den az 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren iki suşun aynı türe ait olmadığını gösteren birçok çalışma yer almaktadır (156, 168-171).

Resmi olarak tanımlanmış ve isimlendirilmiş filogenetik olarak en yakın akraba türler ile karşılaştırıldığında, % 97.0 ve % 95.0 oranındaki 16S rRNA gen dizi benzerlik değerleri, bakteriyel izolatların, sırasıyla, tür ve cins seviyesinde yeni bir takson olarak tanımlanmasında eşik değerler olarak kullanılmaktadır (156, 171).

Yeni bir türün sınıflandırılmasında eşik değer olarak kabul edilen % 97.0 oranındaki 16S rRNA gen dizi benzerlik değeri, 2006 yılında yapılan bir çalışma ile % 98.7-99.0'a çıkarılmıştır (6). 2013 yılında, 571 adet suşun 16S rRNA gen dizileri ile DDH sonuçlarının karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada ise benzer aralıklarda bir eşik değerin (≥ % 98.2-99.0) kullanılması önerilmiştir (172).

2006 ve 2013 yıllarına ait bu son literatür verilerine rağmen, günümüzde taksonomik çalışmalarda, genellikle iki suş arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliğinin % 97.0 ve üzerinde olması durumunda, iki tür birbirinden yeterince ayırt edilemediğinden, taksonomik benzerliklerinin doğrulanması için gerçekleştirilen DNA-DNA hibridizasyonu ya da ayrım gücü yüksek diğer moleküler teknikler halen en kabul gören genetik yaklaşımlardır. Bu yöntemler fenotipik testler kullanılarak yapılmış olan tanımlama ile de uyumluluk göstermelidir (167).

16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılmasıyla elde edilen taksonomik bilgi, cins seviyesindeki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde önem taşımakla birlikte, evrimsel olarak oldukça iyi korunmuş olması nedeniyle, yakın akraba türler arasındaki sınıflandırmalarda yeterli ayrımı sağlayamamaktadır. Bununla birlikte, tek bir genomda çoklu rRNA operonları arasındaki nükleotid varyasyonların ve farklı bakteri cinslerinde farklı sayıda 16S rRNA gen kopyalarının varlığı, tür düzeyindeki karşılaştırmalı analiz

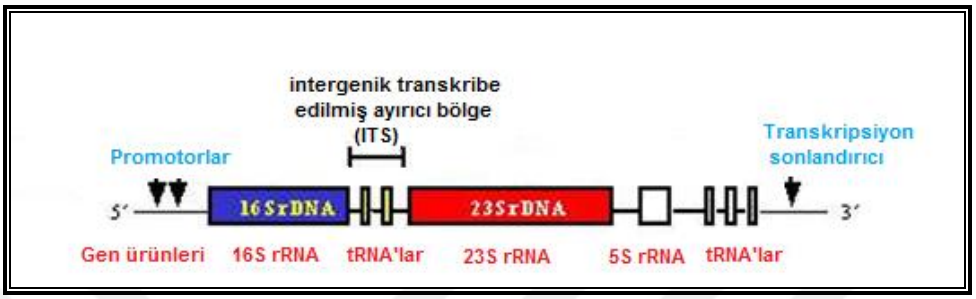
sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebilmektedir (54, 160). Bu nedenle, 16S rRNA gen dizilemelerinin birden fazla tekrarlanarak analiz sonuçlarının doğrulanması tür teşhisinde önemli bir parametredir. Ancak, 16S rRNA gen dizileri birbirine önemli ölçüde benzerlik (% 93.8-99.7) (bu çalışma) gösteren *Anoxybacillus* türleri gibi filogenetik olarak yakın ilişkili türler arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde 16S rRNA gen dizileri yetersiz kalmaktadır (173). Bu nedenle, *Anoxybacillus* türlerinin tanımlanmasına yönelik çalışmalarda, 16S rRNA gen dizilerinden elde edilen veriler, % 97.0 ve üzeri dizi benzerliği görüldüğü durumlarda, çoğunlukla çeşitli moleküler analizlerin yanı sıra DNA-DNA hibridizasyonu ile de desteklenmelidir (5, 54, 156).

Karşılaştırmalı dizi analizleri öncesinde, ilk olarak ham dizi verileri CLUSTAL_X, CLUSTAL W, CLUSTAL X2, CLUSTAL W2, MEGA, T-COFFEE, MUSCLE BLAST ve CLUSTALX gibi çoklu hizalama programları kullanılarak hizalanır. Bakteri türleri arasındaki akrabalık ilişkisinin derecesi, hizalanan bu dizilerle PAUP, PHYLIP ve MEGA gibi programlar kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç ya da dendrogram yardımıyla tespit edilebilir. Filogenetik ağaç, bakteri suşlarının tahmini olarak hangi cinse ait olduğunu ve gerçekleştirilecek genotipik, kemotaksonomik ve fenotipik analizler için gerekli, çeşitli kültür koleksiyonlarından elde edilebilecek, ilgili suşlarla % 97.0'den fazla 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren yakın akraba türlerini göstermektedir. Bir dendrogram oluştururken suşların evrimsel hiyerarşisini gösterecek bir kök vazifesi gören farklı bir dış grup (ilgilenilen bakteri grubu dışında bir takson) seçilebilir. Taksonomik pozisyonun değerlendirilmesi amacıyla neighbour-joining, maksimum-parsinomi, maksimum-likelihood yöntemleri gibi farklı ağaç oluşturma algoritmaları kullanılmaktadır. Bu metotlarla aynı dizi verileri farklı yollarla işlenerek farklı sonuçlar elde edilebilir. Bu nedenle, en az iki yöntemin kullanılması ve filogenetik ilişkiyi en iyi şekilde yansıtacak ağaç modelinin kullanılması gerekmektedir (2, 162, 166).

2.3.3.2. ITS (Internal Transcribed Spacer) Bölgeleri

ITS (intergenik transkribe edilmiş ayırıcı) bölgesi, prokaryotik mikroorganizmalarda 16S ve 23S rRNA genleri arasında yer alan ve temelde kodlayıcı-olmayan diziler içeren genomik bir DNA bölgesi olup, bakteriyel suş tiplendirilmesinde kullanılan ilk kodlayıcı-olmayan dizilerdir (174, 175).

ITS bölgeleri, evrimsel olarak oldukça korunmuş olan 16S rRNA gen dizilerine göre daha fazla çeşitlilik içermektedir. ITS bölgelerindeki bu polimorfizmin sebebi, uzunluk ve dizi bakımından önemli ölçüde farklılık gösteren birden çok ribozomal operonda yerleşmiş tRNA genlerinin varlığıdır. Bunun yanı sıra, allel sayısı ve kromozomdaki pozisyonları bakımından da değişkenlik gösterirler (175-177). 16S ve 23S rDNA gen bölgesi arasındaki ITS bölgesinin konumu Şekil 2.4'te gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Çoğaltılan 16S ve 23S rDNA gen bölgesi arasındaki ITS bölgesinin 30S pre-rRNA geni üzerindeki gösterimi (178)

16-23S rRNA arasındaki ITS bölgesinin çoğaltılması genellikle ITS-PCR olarak tanımlanır. rRNA genleri arasındaki ara bölge, hedef bölge olduğu için yöntem aynı zamanda PCR-ribotiplendirme olarak da adlandırılır. ITS-PCR parmak izi tekniğinde, ITS bölgesindeki bu polimorfizmden yararlanılarak uzunluk ve dizi bakımından farklılık gösteren çoklu ribozomal operonlar içeren bakteriler tür ve alt tür seviyesinde tanımlanabilmektedir (54, 166). Daffonchio ve ark. (2003), *Bacillus cereus* grubundaki türler ile yakın ilişkili suşları ayırmak için ITS-PCR tiplendirme yöntemini kullanmışlardır. *Bacillus* ve ilgili cinslere ait spor-oluşturan bakterilerin genomlarında 30S pre-rRNA genlerine ait çoklu ribozomal operonlar yer almaktadır. *Bacillus cereus* ve ilgili türlerde en fazla 12 ribozomal operon bulunur. Farklı operonlardaki ITS dizilerinin uzunlukları çeşitlilik gösterdiğinden, PCR amplifikasyonu sonucunda tür seviyesinde tipik bir bant profili meydana gelir (179). Bu polimorfizm, Belduz ve ark. (2003), Cihan ve ark. (2011), Zhang ve ark. (2013) ve Cihan ve ark. (2014) tarafından yapılmış olan çalışmalarda, sırasıyla *A. gonensis*, *A. salavatliensis*, *A. vitaminiphilus* ve *A. calidus* türlerinin yakın ilişkili *Anoxybacillus* türlerinden ayrılması amacıyla kullanılmıştır (71, 72, 80, 82).

2.3.3.3. Genomik Parmak İzi Teknikleri

Bakteriyel taksonomide yaygın olarak kullanılan genomik parmak izi teknikleri şunlardır: AFLP (çoğaltılmış fragment uzunluk polimorfizmi), PFGE (pulsed field jel elektroforezi) sonrası gerçekleştirilen makrorestriksiyon analizi, RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik

DNA analizi), ERIC-PCR (enterobakteriyel intergenik tekrar eden konsensus dizilerin PCR'ı), boxA ve $(GTG)_5$ elementlerini içeren tekrar dizilerinin çoğaltıldığı BOX-PCR ve $(GTG)_5$-PCR tekniklerini içeren *Rep*-PCR, ribotiplendirme, RFLP (restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi), MLST (çoklu lokus dizi analizi) ve ARDRA (Çoğaltılmış ribozomal DNA restriksiyon analizi). Genel olarak, kullanılan bu teknikler tür ve/veya alt tür seviyesinde bilgi vermektedir (4). Bu kısımda, sadece bu tez çalışması kapsamında kullanılan genomik parmak izi tekniklerinden bahsedilmektedir.

2.3.3.4. REP (Tekrarlanan Ekstragenik Palindromik) Elementler

Birçok farklı prokaryotik genomda çeşitli tekrarlı DNA dizi sınıfları bulunmaktadır. Ribozomal RNA genleri ve insersiyon dizileri gibi kodlayıcı diziler, kopya sayısı düşük oranda bulunan büyük tekrarlı elementleri temsil etmektedir. Bu büyük tekrarlı elementlerin aksine, nispeten kısa polinükleotid dizi profilleri prokaryotik genomlarda çok tekrarlı diziler halinde bulunabilirler (180). Bu diziler, intersistronik (sistronlar arası) lokasyona sahip, translasyona uğramayan ve transkripsiyon sonlanması, mRNA stabilitesi ya da kromozomal organizasyonda görev aldıkları düşünülmesine karşın, fonksiyonları tam olarak bilinmeyen dizilerdir. Bu diziler, kodlayıcı diziler olmamakla birlikte, kodlayıcı diziler içeren ve daha büyük olan diğer tekrarlı elementlerle kıyaslandıklarında kopya sayıları çok daha yüksektir (181).

Palindromik birimler (PU) olarak da bilinen tekrarlanan ekstragenik palindromik (REP) diziler (182) ve enterobakteriyel tekrarlanan intergenik konsensus (ERIC) dizileri (183), bu elementlerden en iyi karakterize edilmiş olanlarıdır ve ilk kez sırasıyla *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'de tanımlanmışlardır. Tekrarlanan ekstragenik palindromik (REP) elementler, birçok bakterinin genomunda bulunan, evrimsel olarak korunmuş ve çoklu kopyalar halinde bulunan tekrarlı ve kodlayıcı olmayan DNA dizileridir. REP konsensus dizisi, merkezi bölgede 5 bç'lik bir değişken loop ile kararlı bir kök-loop yapısı oluşturabilen, genellikle 35-40 bç uzunluğunda yüksek oranda korunmuş bir palindromik dizi içermektedir (182, 184). Genomda 50-1000 arasında değişen REP dizi kopyası bulunabilir ve en fazla 6 kopyanın ardışık olarak düzenlendiği kümeler halinde bulunurlar (185-187). REP dizilerinin birbirine bitişik kopyaları 25 bç'den az dizilerle ayrılır ve birbirlerine göre ters oriyantasyonda bulunurlar ve böylece RNA saç tokası yapılarının oluşması sağlanır (182).

REP dizisinin protein için kodlayıcı olan bir dizide bulunduğuna dair herhangi bir örnek bulunmamaktadır. Bu zamana kadar tanımlanan tüm kopyalar, genomun ekstragenik, translasyona uğramamış bölgelerinde, ya tek bir operonun parçası olarak birlikte transkripte olmuş iki gen arasında ya da bir operonun translasyona uğramamış 3' bölgesinde farklı konumlarda, ardışık diziler halinde ve genom boyunca dağılmış operonlarda konumlanmışlardır (182, 186, 188-190). REP dizilerinin genel dizi özelliklerine bakıldığında, ardından tamamlanmamış bir GC-zengin palindrom dizisinin geldiği, 5' ucunda bulunan değişmez bir tetranükleotid GTAG ya da GTGG dizisinin varlığı ile tanımlanırlar. REP palindromlarının uzunluğu ve dizileri oldukça değişkenlik göstermesine karşın, sadece palindromik diziler ile bunların tek zincirli sekonder yapılara katlanma potansiyelleri evrimsel olarak korunmuştur (191). Fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber, bu dizilerin palindromik yapısı ve transkripte olmuş RNA içinde kararlı kök-loop yapılarını oluşturabilme yetenekleri, bakterilerde transkripsiyonel terminasyon, mRNA stabilitesi ve kromozomal organizasyon ile ilişkili düzenleyici rollerde görev aldıkları düşünülmektedir (180, 192).

Şu ana kadar 3 tekrarlı DNA dizi ailesi tanımlanmıştır:

a) merkezi, korunmuş palindromik yapılara sahip, 124-127 bç uzunluğunda ve genom başına 30-150 kopya halinde bulunan enterobakteriyel tekrarlı intergenik konsensus (ERIC) dizileri (183),

b) $(GTG)_5$ gibi politrinükleotid dizileri (193),

c) boxA (59 bç), boxB (45 bç) ve boxC (50 bç) olmak üzere üç korunmuş alt birimden oluşan BOX elementleri (187).

BOX elementleri, kararlı kök-loop yapıları oluşturma potansiyeline sahip palindromik diziler olup, genomun intergenik bölgelerinde yer alırlar. Sadece boxA-1 alt birimine ait diziler, bakteriler arasında evrimsel olarak korunmuş halde bulunmaktadır. BOX elementleri, boyut, kopya sayısı ve kararlı kök-loop yapılarını oluşturma potansiyeli bakımından benzerlikler gösterse de dizileri prokaryotik REP DNA dizilerinden tamamen farklıdır (181, 187). Ayrıca, yapısal olarak benzerlik göstermelerine karşın, ERIC dizilerinin nükleotid dizisi REP konsensus dizilerinden tamamen farklılık gösterir (183).

Rep-PCR, her bir bakteriyel izolatın DNA parmak izini elde etmek için genomda birden çok kopyasının doğal olarak bulunduğu, oldukça korunmuş ve tekrarlanan dizilere komplementer oligonükleotid primerlerinin kullanıldığı DNA amplifikasyonuna dayalı bir genomik parmak izi tekniğidir (180). PCR'a dayalı amplifikasyonda, primer olarak dejenere, tekrarlayan oligonükleotid dizileri ilk kez Versalovic ve ark. (1991) tarafından kullanılmıştır. Tekrarlanan DNA dizilerinin *E. coli* kromozomunda farklı konumlarda dağılım gösterdikleri ve farklı aralıklarla birbirlerinden ayrıldıkları öne sürülmüş ve bu nedenlerden dolayı, bu dağılmış tekrarlayan dizilerin primer bağlanma bölgeleri olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (192). Bu tekrarlanan elementlerin birçoğu çeşitli bakteri cinslerinde korunmuş haldedir ve bu nedenle, birçok farklı mikroorganizmada DNA parmak izi tekniği için tek bir primer seti kullanılabilir. Bu konsensus dizilerini içeren primerler kullanılarak ERIC, $(GTG)_5$ ve BOX dizileri arasında yerleşmiş ayırıcı bölgeler çoğaltılabilir. Bu yöntemler, sırasıyla, ERIC-PCR, $(GTG)_5$-PCR ve BOX-PCR genomik parmak izi teknikleri olarak adlandırılır. Bu yöntemlere toplu olarak *Rep*-PCR genomik parmak izi tekniği denir (181, 194-196).

REP ve ERIC-PCR tekniğinde kullanılacak primerler, tekrarlanan bölgelerin dışından, BOX-PCR'da ise boxA alt ünitesinden başlayacak şekilde tasarlanabilirler (180, 181, 192, 197, 198). ERIC primer setleri, REP primer setlerine kıyasla daha kompleks profillerin oluşumuna sebep olmaktadır. Bununla birlikte, ERIC primerlerinin olası kontaminantlara karşı daha duyarlı oldukları bilinmektedir (199). Bir Gram-pozitif türde (*Streptococcus pneumoniae*) bulunan ilk tekrarlayan intergenik dizinin, yaklaşık 154 bç uzunluğundaki BOX elementi olduğu saptanmıştır (187). BOX primerinin kullanımı oldukça kompleks profiller oluşturur ve genellikle bakteriyel izolatların ayrımı ve karakterizasyonu için yeterlidir (200).

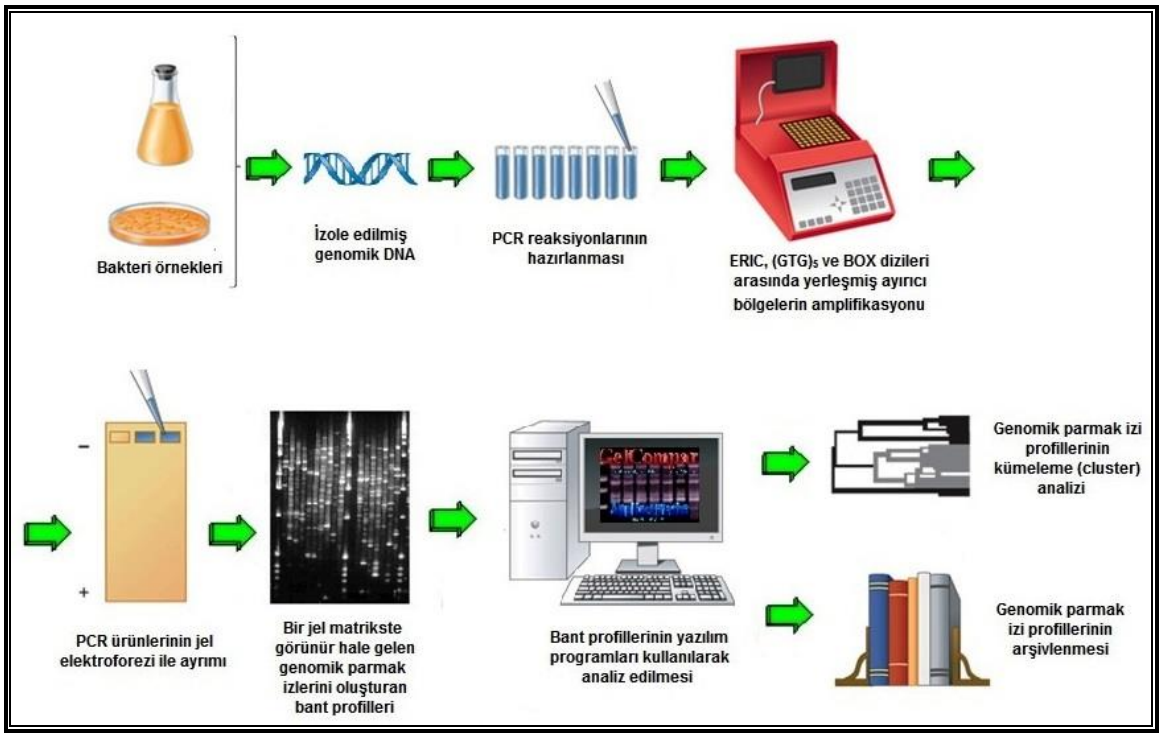
Her bir mikrobiyal suş ya da izolat, genomunun farklı bölgelerine yerleşmiş tekrarlayan dizilere sahip olduğundan, primer olarak bu tekrar dizileri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda, bitişik tekrar elemanlarının bağlanma bölgeleri arasındaki genomik mesafe ile doğru orantılı olarak boyutları birbirinden farklı birden fazla amplikon oluşmaktadır. PCR ürünlerinin elektroforezle ayrımı sonrası oluşan bant profilleri, bakterilerin alt türlerinin ayrımı ve türlerin belirlenmesi amacıyla kullanılabilen, her bir bakteriyel suş ya da izolat için spesifik DNA parmak izlerini oluştururlar. Bant boyutlarındaki farklılıklar, farklı genomlardaki tekrarlı diziler arasındaki

uzaklıkların polimorfizmini temsil etmektedir (199, 201, 202). Bant profilleri, bilgisayara bağlı bir tarayıcı ya da densitometre ile kaydedilebilir. Dijitalleştirilmiş, optimize yoğunluk değerleri bir bilgisayara aktarılır ve bant profilleri densitogramlar olarak saklanır. Gel Compar (Applied Maths, Belçika) ya da Dendron (Solltech, Oakdale, CA) gibi yazılım programları kullanılarak da bant profilleri analiz edilebilir. Bu programlar, genomik parmak izlerinin normalize edilmesini, veri tabanlarının oluşturulmasını ve benzerliklerin kantitatif tayini ile bu parmak izlerinin gruplandırılmasını ya da tanımlanmasını sağlarlar (166, 190, 192). *Rep*-PCR genomik parmak izi tekniği Şekil 2.5'te özetlenmektedir.

Rep-PCR tekniğinin diğer nükleik asit parmak izi tekniklerinden en önemli farkı, bakterinin tüm genomundaki tekrarlı dizilerin taranması ile suşların tür ve alt tür seviyesinde ayrılmasına olanak sağlamasıdır (203). *Rep*-PCR; (i) kolay uygulanabilir, (ii) yüksek ayrım gücüne sahip, (ii) düşük maliyetli olması ve (iv) çok sayıda izolat ile çalışma imkanı sağlaması bakımından bakterilerin sınıflandırılması ve tiplendirilmesi için güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmektedir (204).

Ticari, yarı-otomatize bir *Rep*-PCR DNA parmak izi sistemi olan DiversiLab™ sisteminin geliştirilmesiyle elle-yapılan, jel bazlı *Rep*-PCR yöntemine kıyasla standardizasyon ve tekrarlanabilik anlamında önemli ilerlemeler sağlanmıştır (195). Bu sistem ile web-tabanlı yazılım kullanılarak parmak izi profilleri arşivlenebilmekte ve karakterize edilmiş suşlar ile oluşturulmuş veri tabanları, bilinmeyen örneklerin araştırılmasında referans kütüphaneler olarak kullanılabilmektedir (200).

Anoxybacillus cinsinin yakın ilişkili türlerinin ayırt edilebilmesi için, bazı çalışmalarda *Rep*-PCR tekniği kullanılmıştır (39, 70, 71, 82, 83, 205). Tüm bu çalışmalar, *Rep*-PCR parmak izi tekniğinin termofilik bakterilerin tür ve alt tür seviyesinde ayrılmasında hızlı, uygulanması kolay ve tekrarlanabilen bir yöntem olduğunu göstermiştir. ERIC-, BOX- ve $(GTG)_5$-PCR reaksiyonlarında birçok primer setinin kullanıldığı çalışmalarda; *Geobacillus*, *Anoxybacillus* ve *Bacillus* cinslerine ait termofilik bakteri türlerinin tanımlanmasında uygulanan *Rep*-PCR tekniği için en uygun primerlerin $(GTG)_5$ ve BOXA1R primerleri oldukları görülmüştür (39, 71, 206). Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarla BOX-PCR'ın ERIC-PCR ile karşılaştırıldığında, daha yüksek genetik polimorfizm gösterdiği gözlenmiştir (39, 205). Diğer benzer çalışmalarda, *Rep*-PCR'ın *Bacillus* ve *Geobacillus* cinsine ait mezofilik ve termofilik türlerin genotipik olarak ayrılmasında da oldukça etkin bir yöntem olduğu gösterilmiştir (39, 207-209).



Şekil 2.5. *Rep*-PCR genomik parmak izi tekniği (199)

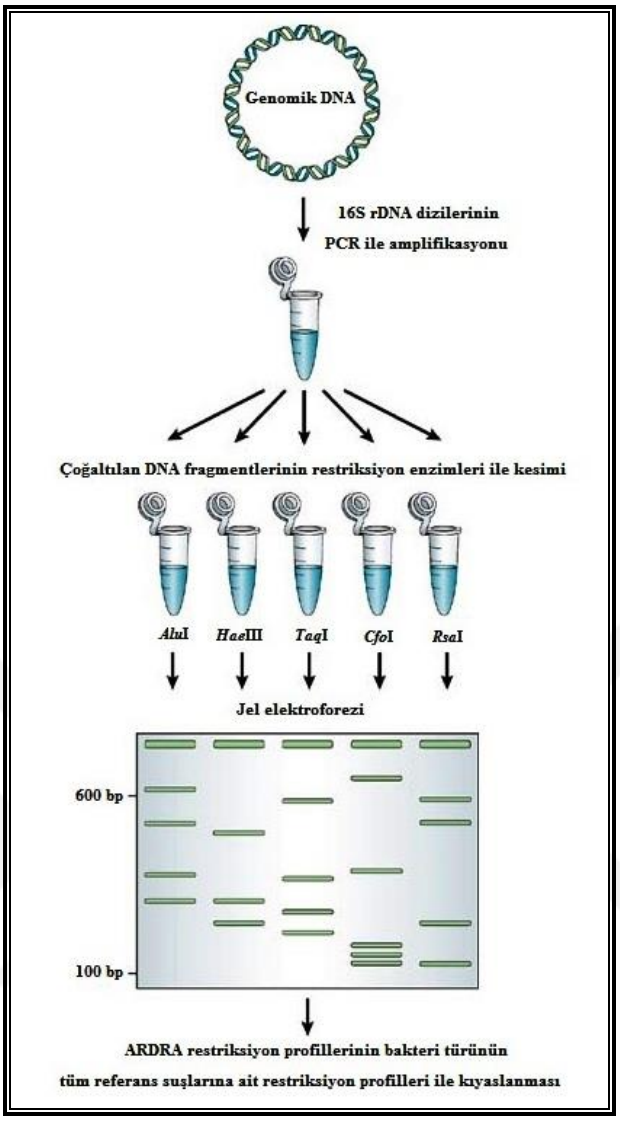
2.3.3.5. Çoğaltılmış Ribozomal DNA Geni Restriksiyon Analizi (ARDRA-Amplified rDNA restriction analysis)

Çoğaltılmış ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA), genellikle rDNA polimorfizmini temel alarak mikrobiyal çeşitliliğin araştırılmasında kullanılmaktadır. 16S rRNA gen bölgesi, evrimsel olarak korunmuş ve türler arası değişken dizilere sahip olması nedeniyle, bakteri türlerinin sınıflandırılmasında önemli bir belirteç olarak kullanılmaktadır (210). 16S rDNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanan ARDRA analizinde, evrensel ya da türe özgü spesifik primer çiftleri kullanılarak 16S rDNA gen bölgesi çoğaltıldıktan sonra, amplifiye edilen bölgeler farklı restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilir ve elde edilen DNA fragmentlerinin agaroz ya da akrilamid jellerde ayrılması sağlanır. Elde edilen bant profilleri, GelCompar gibi bir yazılım programı kullanılarak normalize edilir ve birleştirilir. Son olarak, sayısal analiz, birleştirilmiş ARDRA restriksiyon profillerinin türe ait tüm referans suşların restriksiyon profilleri ile karşılaştırılması neticesinde, desenlerindeki benzerliklere göre araştırılan türün genotipik olarak gruplandırılmasını sağlar. Bu yöntem, filogenetik profillere göre RNA operonu üzerindeki restriksiyon bölgelerinin evrimsel olarak korunmuş olması temeline dayanmaktadır (211, 166). Şekil 2.6'da ARDRA tekniğinin aşamaları görülmektedir (212).

ARDRA tekniğinde dört bazlık bölgeyi tanıyan (tetracutter) restriksiyon enzimleri kullanıldığında, genellikle her genom için 3-5 bant profili elde edilmektedir (211). Türler ve alt-türler arasındaki ve operonlar arasındaki varyasyonu tespit edebilmesi ve her takson için çok sayıda suşun nispeten hızlı bir şekilde analizine imkan vermesi nedeniyle, bu teknik belirli bir filogenetik ve taksonomik bilginin elde edilmesi için oldukça uygundur. Bazı yakın ilişkili türlerin ayrımı için birden fazla restriksiyon profilinin karşılaştırılması gerekmektedir (166, 213).

ARDRA analizinin *Bacillus* ve *Geobacillus* cinsi gibi termofilik, sporlu bakterilerin genotipik olarak gruplandırılmasındaki etkinliği birçok araştırmada gösterilmiştir (207, 214-217). Yapılan çalışmalarda, genotiplendirme için *Alu*I, *Cfo*I, *Hae*III, *Hinf*I, *Mse*I, *Rsa*I ve *Taq*I restriksiyon endonükleazları kullanılmış ve bu enzimlerden en sık kullanılanları, en fazla ayırt edici bant ürettikleri için *Alu*I ve *Hae*III enzimleri olmuştur. Cihan ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada da *Bacillus* cinsine ait izolatların genotipik çeşitliliğinin belirlenmesinde, restriksiyon fragment sayısı itibariyle, *Alu*I ARDRA profillerinin, *Hae*III ve *Taq*I enzimleri kullanılarak elde edilen ARDRA profillerinden daha iyi sonuç verdikleri gözlenmiştir (66).

Anoxybacillus cinsine ait türler için ARDRA profillerini gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Cihan (2013) tarafından, *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşların *Alu*I, *Hae*III ve *Taq*I restriksiyon enzimleriyle kesilmiş amplifiye 16S rRNA geninin PCR ürünleri ile kümeleme analizleri gerçekleştirilmiştir. *Alu*I, *Hae*III ve *Taq*I enzimleriyle kesim sonucunda toplamda sırasıyla 28, 27 ve 31 ARDRA bant profili gözlenmiştir. Bu kesim desenleri arasında, *Taq*I restriksiyon bölgelerinin diğer iki restriksiyon enzim kesim bölgelerinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *Hae*III-ARDRA analizinden elde edilen kümelerin 12 referans suşunu 11 farklı kümeye ayırmasına karşılık, *Taq*I restriksiyon fragmentlerinin 31 küme ile *Anoxybacillus* cinsi için genellikle daha ayırt edici olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak; ARDRA analizi *Rep*-PCR, ITS-PCR gibi DNA parmak izi teknikleri ve diğer 16S rRNA gen dizi analizine dayalı tekniklerle birlikte kullanıldığında, yeni bakteri türlerinin tanımlanması için DNA-DNA hibridizasyonu gibi daha detaylı moleküler tekniklerde kullanılacak suşların belirlenmesinde uygulanabilecek kolay ve güvenilir bir yöntemdir (148).



Şekil 2.6. Çoğaltılmış ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA) (212)

2.3.3.6. DNA-DNA Hibridizasyonu (DDH)

DNA-DNA hibridizasyon (DDH) tekniği, yeni izolatın genomik DNA'sının 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre seçilmiş en yakın akraba türlerin genomik DNA'sıyla karşılaştırılması sonucunda türler arasındaki genetik benzerlik derecesinin ölçülmesinde kullanılmaktadır (158). 1960'ların sonlarında, mikrobiyoloji alanında ilk ortaya çıkışından (218) bu yana prokaryot sistematiğinde uygulanmakta olan bu teknik, günümüzde yeni bir türün tanımlanmasında kullanılan "altın standart" kriter olarak kabul edilmektedir (4, 160).

DDH tekniği; i) G+C içeriği (% mol), ii) tampon çözeltinin iyonik gücü ve iii) DNA hibritinin erime sıcaklığı (T_m) olmak üzere üç parametreye dayanmaktadır. Optimum renatürasyon sıcaklığının ayarlanabilmesi için deney öncesinde incelenecek suşların DNA G+C içeriklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Sadece T_m değeri değişken parametre olup,

T_m hesaplaması hibridize edilecek suşların DNA'larının % G+C içeriği esas alınarak yapılmaktadır. Heterodupleks DNA molekülleri arasındaki benzerlik ne kadar fazla olursa, bu yapıyı çözmek için daha yüksek sıcaklığa (yüksek T_m değeri) gerek duyulur. Hibridizasyonlar genellikle T_m-30^oC ve/veya T_m-15^oC koşullarında gerçekleştirilir (4, 166).

Standart koşullar altında, hibrit ve homolog DNA iplikçikleri arasındaki erime sıcaklıkları farkını gösteren ΔT_m değerinin, tür teşhisinde önemli bir parametre olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bir türün tanılanması için ΔT_m değerinin belirlenmesi gerekmektedir. ΔT_m değerleri ile DDH değerleri arasında bir korelasyon bulunmaktadır. % 70'den büyük DDH değeri gösteren suşların, 5^oC'den küçük ΔT_m değerine sahip olduğu kabul edilmektedir. DDH deneylerinde sadece 5^oC ya da daha az erime sıcaklık farklılığı (ΔT_m) gösteren suşlardan elde edilen DNA'ların kullanılması önerilmektedir (54, 219).

Wayne ve ark. (1987), bazı istisnai durumlar olsa da, yeni bakteri türlerinin tanımlanmasında DDH eşik değerini % 70 olarak önermişlerdir. DDH değerinin % 70 ya da daha düşük olması durumunda, test edilen bakterinin farklı bir türe ait olduğu kabul edilmektedir. DDH ve 16S rRNA gen dizi benzerliği arasındaki ilk karşılaştırmalı çalışmalar, % 97.0 oranındaki 16S rRNA gen dizi benzerliğinin % 70 DDH değerine karşılık geldiğini göstermiştir (5, 7).

2002 yılında, bakteri sistematiği alanında uzman taksonomistlerden oluşan "*ad-hoc committee*" üyeleri tarafından prokaryot taksonomisinde kullanılan güncel yöntemlerin yeniden değerlendirilmesi sonucunda, özellikle dizilenmiş genom sayılarındaki artış nedeniyle gelişmekte olan birçok yönteme rağmen, o yıllarda mevcut daha iyi bir alternatif yöntemin bulunmadığı anlaşılmıştır. Tür tanımlamada kullanılan DNA-DNA hibridizasyon yönteminin tekrarlanabilirlik, kolay bir şekilde uygulanabilirlik anlamında bazı dezavantajlarının bulunmasına rağmen, bu yöntemin geçerli ve güvenilir bir yöntem olduğuna karar verilmiştir. 2000'li yılların başında, taksonomik çalışmalarda genellikle iki suş arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliğinin % 97.0 ve üzerinde olması durumunda, DNA-DNA hibridizasyon analizlerinin yapılması kuvvetle önerilmekteydi (156). Eğer yeni takson birden fazla tip suşa bu derece yüksek oranda benzerlik gösteriyorsa, suşun ya da suşların yeni bir takson grubu olarak sınıflandırılabilmesi için tüm ilişkili tip suşları arasında DDH analizinin yapılması gerekmektedir (4, 158, 159). Bununla birlikte, bazı suşlar arasında % 99.0 oranında 16S rRNA gen dizi benzerliği bulunmasına karşın, DDH

sonucunda % 70 ya da daha düşük bir hibridizasyon oranı elde edilebilir ve bu suşlar yeni tür olarak tanımlanabilir (63, 219).

Bu nedenlerle, son yıllarda özellikle 16S rRNA gen dizi benzerliği ile DDH değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren mevcut verilerin yeniden değerlendirilmesi sonucunda, yeni izolatların tanımlanması için 16S rRNA gen dizi benzerliğinin yalnızca ≥ % 98.2-99.0 olması durumunda, DDH deneylerinin yapılabileceği öne sürülmüştür (6, 172, 220). 16S rRNA gen dizi benzerliği eşik değerinin % 99.0 olarak uygulanması durumunda, DNA-DNA hibridizasyon analizi uygulanmaz ise tüm vakaların yaklaşık % 2.5'unda iki suş yanlışlıkla farklı türler olarak sınıflandırılabilmektedir. % 98.8 benzerlik eşik değeri kullanıldığında ise maksimum hata 100 vakada 1'e düşmektedir (172). Yapılan çalışmalar sonucunda, % 97.0 ve üzerindeki 16S rRNA gen dizi benzerliği ile 10.000 suş çiftinden sadece birinin DNA-DNA hibridizasyon değerinin % 70'in üzerinde olduğu belirlenmiştir (158, 161).

% 70 DDH eşik değerinin tüm bakteri cinslerinin tanımlanmasında uygulanamaması (özellikle filogenetik olarak çok yakın türlerde), sınırlı sayıdaki laboratuvarın altyapısında bulunan özel donanıma gereksinim duyulması, yüksek seviyede standardize edilmiş koşullar ve yoğun iş gücü gerektiren, pahalı bir yöntem olması DDH tekniğinin kısıtlayıcı özellikleridir. Ancak, günümüzde bakteriyel taksonomik çalışmalarda hala altın standart teknik olarak kullanılmaktadır. Bu teknik kullanılarak 5.000'den fazla bakteri türü başarılı bir şekilde tanımlanabilmiştir (4, 166).

2.3.3.7. DNA Baz Kompozisyonu: % G+C İçeriği

DNA'nın guanin ve sitozin mol yüzdelerinin (G+C % mol) belirlenmesi genomik içerik hakkında bilgi sağlayan klasik bir yöntemdir. Günümüzde bir mikroorganizmanın taksonomik pozisyonunun belirlenmesi için diğer genotipik yöntemlerle birlikte kullanılmaktadır. Bakterilerde genel olarak, G+C içeriği % 24-76 arasında değişmektedir. Bu oran tür için spesifik olup seçici değildir, yani benzer G+C içeriğine sahip iki suş aynı türe ait olabilir ya da olmayabilir. Literatür verileri, tür içindeki G+C içeriğinin en fazla % 3 (221) ya da % 5 (219) oranında değiştiğini göstermektedir. G+C içerikleri % 10'dan fazla farklılık gösteren bakterilerin aynı cinse ait olmadıkları deneysel olarak gösterilmiştir (219).

Bakteriyel DNA'nın % G+C içeriği, DNA-DNA hibridizasyonunun kullanılacağı durumların belirlenmesi için önemli bir ön koşuldur (4). Termal denatürasyon metodu veya HPLC ile tüm genomun baz dizilerinin belirlenmesi, DNA'nın % G+C içeriğinin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemlerdir (222-224). DNA'nın % G+C içeriği ve erime sıcaklığı arasındaki ilişki, yeni bakteri türlerinin tanımlanmasına yönelik taksonomik çalışmalarda önemlidir (225). Bahsedilen yöntemlerden farklı olarak, tüm genom dizisi mevcut mikroorganizmaların DNA'larındaki G+C içeriğinin tespiti için, DNA'nın termal denatürasyon sıcaklığına dayalı bir florometrik yöntem de kullanılmaktadır (226).

2.4. α-AMİLAZLAR

2.4.1. AMİLAZLARIN SINIFLANDIRILMASI

Nişastanın hidrolizini katalizleyen amilazlar, nişastanın yapısındaki etki ettikleri glikozidik bağa göre endoamilazlar ve ekzoamilazlar olarak sınıflandırılırlar (27, 29, 227). Endoamilazlar, amiloz ya da amilopektin zincirinin iç kısmında yer alan α,1-4 glikozidik bağlarını rastgele parçalayarak α-anomerik ürünlerin oluşumuna neden olurlar. α-1,4-glukan-4-glukanohidrolaz olarak da bilinen α-amilaz (EC 3.2.1.1), iyi bilinen bir endoamilaz olup bakterilerin yanı sıra arkeleri da içeren çok sayıda mikroorganizmada bulunmaktadır (25, 26). α-Amilazlar, nişasta zinciri boyunca rastgele noktalara etki ederek uzun zincirli karbohidratları parçalarlar ve hidrolizin son ürünleri, α-konfigürasyonuna sahip değişen uzunluklardaki oligosakkaritler ile dallanmış oligosakkaritleri oluşturan α-limit dekstrinlerdir. α-Amilazlar, kalsiyum metalloenzimler olup kalsiyum yokluğunda çoğunlukla fonksiyonlarını kaybederler (25, 27).

Ekzoamilazlar, β-amilaz (EC 3.2.1.2) gibi sadece α,1-4 glikozidik bağlarını ya da amiloglukozidaz veya glukoamilaz (EC 3.2.1.3) ve α-glukozidaz (EC 3.2.1.20) gibi hem α,1-4 hem de α,1-6 glikozidik bağlarını parçalayabilirler. Ekzoamilazlar, amiloz ya da amilopektin zincirinin dış kısmında yer alan glukoz birimlerine etki ederler ve bu nedenle, son ürün olarak sadece glukoz (glukoamilaz ve α-glukozidaz) ya da maltoz ve β-limit dekstrinler (β-amilaz) oluştururlar. β-Amilaz ve glukoamilaz, aynı zamanda reaksiyon sonunda açığa çıkan maltozun anomerik konfigürasyonunu α'dan β'ya dönüştürür (228). β-Amilazlar, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* ve *Clostridium* gibi bakteriyel suşlar ile *Rhizopus* ve *Volvariella* gibi fungal suşlar tarafından üretilirler (227). γ-Amilazlar olarak

da bilinen glukoamilaz ya da amiloglukozidazlar diğer amilaz formlarından farklı olarak, asidik çevrelerde özellikle pH 3.0'de optimum aktivite gösterirler (27, 229).

2.4.1.1. CAZy (Carbohydrate Active Enzymes) Sınıflandırma Sistemi ve α-Amilazlar

α-Amilazlar, glikozid hidrolaz (GH) enzim grubuna dahil olup çeşitli sakkaritlere karşı aktif enzimlerin dizi bazlı sınıflandırma sisteminin bir parçasını oluştururlar. Bu sistem, ilk olarak glikozid hidrolazlar için yaklaşık 25 yıl önce geliştirilmiş (230) ve sonrasında güncellenmiştir (231, 232). Günümüzde, bu sistem tüm karbohidrat-aktif enzimler için 1998 yılından beri CAZy (**C**arbohydrate **A**ctive En**Zy**mes) olarak adlandırılan veri tabanında çevrimiçi olarak yer almaktadır (233). Klasik IUB Enzim Terminolojisinin (IUB Enzyme Nomenclature), (GH'lar için EC 3.2.1.x), GH'ların yapısal özelliklerini ve enzimlerin evrimsel yönlerini yansıtmadaki yetersizliği nedeniyle, aminoasit dizilerinin karşılaştırılmasına dayanan CAZy sınıflandırma sistemi kurulmuştur. CAZy sistemi içerisinde, her bir enzim aminoasit dizilerine dayanılarak aileler halinde sınıflandırılır. 1991 yılından günümüze kadar 130'dan fazla enzim ailesi bu şekilde kronolojik olarak oluşturulmuş durumdadır (örn. GH13) (230).

CAZy veri tabanında, ilave olarak iki hiyerarşik sınıflandırma seviyesi daha bulunmaktadır: hiyerarşinin yüksek seviyesi olarak bilinen klanlar ve daha düşük seviyedeki subfamilyalar (233, 234). Bir klan, aynı üç boyutlu katalitik domain yapısına sahip, ancak sınırlı dizi benzerliği gösteren, yani protein yapısı amino asit dizisine göre daha iyi korunmuş olan, iki ya da daha fazla aile içerebilir. Her bir klan oluşumu, tersiyer yapı bilgisine dayanmakla birlikte, bir klan alfabetik sıraya göre kısa çizgi sonrasında gelen bir harf (örn. GH-H) ile gösterilir (233). Bir glikozid hidrolaz subfamilyası ise tüm aile için geçerli olandan daha fazla dizi/yapısal ve işlevsel özellikleri paylaşan bir ailenin üyelerinden oluşan bir gruptur. Belirli bir GH ailesinin subfamilyaları, alt çizgi sonrası eklenen bir sayısal sonek ile gösterilir (örn. GH13_7) (235).

2.4.1.2. α-Amilaz Enzim Ailesi

α-Amilaz enzim ailesi (GH13), tüm glikozid hidrolazların sınıflandırılmasının ilk kez CAZy veri tabanında yayınlanması ile birlikte 1991 yılında oluşturulmuştur. O yıllarda, GH13 ailesi, sınıflandırma kriterleri nedeniyle, α-amilaza ilave olarak α-glukozidaz, dekstran glukozidaz, izoamilaz, pullulanaz, amilopullulanaz, neopullulanaz, siklodekstrin

glukanotransferaz ve bazı ekzo-amilazlar gibi enzimleri içeren polispesifik bir enzim ailesi olarak tanımlanmaktaydı (230). Bu sınıflandırma, çeşitli nişasta hidrolazlarının ve benzeri amilolitik enzimlerin ortak katalitik bölgelere ve katlanmalara sahip olabileceği ve ortak dizi benzerlikleri gösterebilecekleri öngörüsüyle oluşturulmuştur. Günümüzde GH13 ailesi, dizileri ve evrimsel süreçleri bakımından aile üyeleri ile ilişkili olabileceği düşünülen heteromerik amino asit taşıyıcılarının ve 4F2 antijenlerin ağır zincirleri ile temsil edilen enzimatik olmayan üyelerin yanı sıra, hidrolazlar, transferazlar ve izomerazları kapsayan yaklaşık 30 farklı enzim içermektedir (236-239). GH13 enzim ailesi, ağırlıklı olarak bakteriyel kaynaklı 2000'den fazla dizi içermekte olup, 28.000'den fazla üyesi ile ana α-amilaz enzim ailesi olarak kabul edilmektedir (240). α-Amilazlar, esas olarak GH13 enzim ailesinin en önemli temsilcisi olmakla birlikte, GH57 ve GH119 ve hatta GH126 enzim ailesi içerisinde de yer alırlar (240, 241). α-Amilaz ailesi ile ekstremofilik α-amilaz ailesi olan GH57 arasındaki ilişki henüz doğrulanmamış ya da kanıtlanmamıştır (242).

Henrissat (1991)'ın sınıflandırmasına göre; nişastanın hidrolizinden sorumlu enzimlerin çoğu, amino asit dizi benzerliklerine göre α-amilaz enzim ailesine (GH13) aittirler (230) . α-Amilaz enzim ailesinin tüm üyeleri aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmalıdır:

(i) α-Glikozidik bağlara etki ederler ve α-glikozidik bağları hidrolizleyerek α-anomerik mono- ve oligosakkaritlerin oluşumuna neden olurlar (hidroliz) ya da α-1,4 veya α-1,6 glikozidik bağları meydana getirirler (transglikolizasyon) ya da her iki reaksiyon türünü de katalizlerler.

(ii) α-Glikozidik bağın hidrolizi için geri dönüşümlü reaksiyon mekanizmasını gerçekleştirirler (oluşan hidroksil grubu α-konfigürasyonunu korur).

(iii) katalitik domainin özellikle β-iplikçiklerinde bulunan, katalitik amino asitler ile korunmuş $(\beta/\alpha)_8$'li fıçı yapısının topolojisinin stabilitesi için gerekli bazı amino asit köklerini içeren 4-7 arasında değişen korunmuş dizi bölgelerine sahiptirler.

(iv) β4-iplikçiğinde aspartik asit (katalitik nükleofil), β5-iplikçiğinde glutamik asit (proton vericisi) ve β7-iplikçiğinde substrat bağlanması için gerekli olan aspartik asit (geçiş-durumu stabilizatörü) olmak üzere katalitik üçlü amino asit köklerini içeren $(\beta/\alpha)_8$'li fıçı yapısına sahip bir katalitik domain içerisinde aynı katalitik mekanizmaya sahiptirler (228, 242-244). Tüm bu kriterlere sahip α-amilaz ailesi enzimleri Çizelge 2.4'te listelenmiştir.

Çizelge 2.4. α-Amilaz enzim ailesinin üyeleri (klan GH-H) (245)

Enzim sınıfı	Enzim	EC	GH ailesi
Hidrolazlar	α-Amilaz	3.2.1.1	13
	Oligo-1,6-glukozidaz	3.2.1.10	13
	α-Glukozidaz	3.2.1.20	13
	Pullulanaz	3.2.1.41	13
	Amilopullulanaz	3.2.1.1/41	13
	Siklomaltodekstrinaz	3.2.1.54	13
	Maltotetraohidrolaz	3.2.1.60	13
	İzoamilaz	3.2.1.68	13
	Dekstranglukozidaz	3.2.1.70	13
	Trehaloz-6-fosfat hidrolaz	3.2.1.93	13
	Maltohekzaohidrolaz	3.2.1.98	13
	Maltotriohidrolaz	3.2.1.116	13
	Maltojenik α-amilaz	3.2.1.133	13
	Maltojenik amilaz	3.2.1.133	13
	Neopullulanaz	3.2.1.135	13
	Maltooligoziltrehaloz hidrolaz	3.2.1.141	13
	Maltopentaohidrolaz	3.2.1.-	13
	Sükroz hidrolaz	3.2.1.-	13
Transferazlar	Amilosükraz	2.4.1.4	13
	Glukoziltransferaz	2.4.1.5	70
	Sükroz fosforilaz	2.4.1.7	13
	Glukan dallandırıcı enzim	2.4.1.18	13
	Siklodekstrin glukanotransferaz	2.4.1.19	13
	4-α-Glukanotransferaz (amilomaltaz)	2.4.1.25	13, 77
	Glukan dalkırıcı enzim	2.4.1.25/3.2.1.33	13
	Alternansükraz	2.4.1.140	70
	Maltoziltransferaz	2.4.1.-	13
İzomerazlar	İzomaltuloz sentaz	5.4.99.11	13
	Maltooligoziltrehaloz sentaz	5.4.99.15	13
	Trehaloz sentaz	5.4.99.16	13
HAT[a]	rBAT protein	….	13
	4F2hc antijen	….	13

[a] HAT: Heteromerik amino asit taşıyıcı proteinler

GH13 enzim ailesi, katalitik domainin üç boyutlu yapısı olan, klan birimine göre daha ileri derecede sınıflandırılabilir. Glikozidazlar ve transglikozidazlar için tanımlanmış 14 klan (A-N) arasından, α-amilaz ailesi (GH13) 8. klan olan klan GH-H'a aittir (238). Günümüzde, CAZy veri tabanında ana α-amilaz enzim ailesi olarak bilinen GH13, α-amilaz içermeyen GH70 ve GH77 enzim aileleri ile birlikte GH-H klanını oluşturur (233, 244). Klan GH-H enzimleri, bir bütün olarak ele alındığında, sadece katalitik üçlü yapının değişmeden korunmuş olduğu görülmektedir. Kendine özgü birçok enzimin ve çok sayıda dizinin varlığı ve oligo-1,6-glukozidaz ve neopullulanaz subfamilyaları olarak bilinen

enzim alt gruplarının bulunması nedeniyle, GH13 enzim ailesinin daha ileri alt bölümlere ayrılması gerektiği öne sürülmüştür (240). Dizi benzerliğine dayanılarak, şu anda CAZy veri tabanında GH13 ailesine ait 42 subfamilya tanımlanmıştır. Şu ana kadar, GH13_1, 5, 6, 7, 15, 19, 24, 27, 28, 32, 36, 37, 39, 41 ve 42 olmak üzere 15 subfamilyada α-amilazların yer aldığı bilinmektedir. Ancak, CAZy veri tabanında henüz herhangi subfamilyaya dahil edilememiş α-amilaz enzimleri de bulunmaktadır (235, 241, 246, 247).

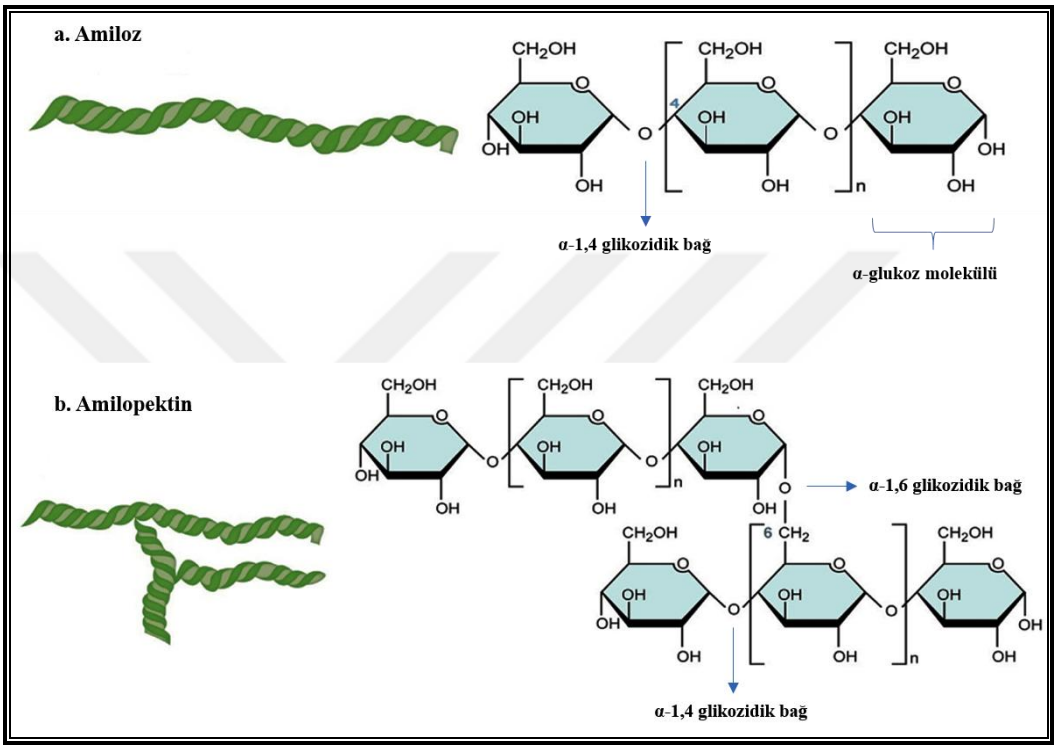
2.4.2. NİŞASTANIN YAPISI VE BİYODEGRADASYONU

Nişasta, glukoz birimlerinin birbirlerine 1. karbon atomunun (C1) oksijeni arasında meydana gelen glikozidik bağlarla bağlanması sonucunda oluşan bir glukoz polimeridir. Bu glikozidik bağ, yüksek pH değerlerinde kararlı iken, düşük pH değerlerinde hidrolize olmaktadır. Polimerik zincirin sonunda indirgeyici uç olarak bilinen bir latent aldehit grubu bulunmaktadır (29, 228).

Nişasta, fotosentezin karanlık evresi süresince özellikle yapraklardaki plastitlerde olmak üzere amiloplast, yumru, tohum ve köklerde bitkisel depo materyali olarak sentezlenmektedir (248). Ham nişasta, molekül içi ve moleküller arası bağlarla biraraya gelen polikristalimsi yapı şeklinde yoğun olarak paketlenmiş, boyut ve şekil bakımından farklılık gösteren granüller halinde depolanmaktadır. Nişasta granülleri, amorf ve kristalimsi bölgeler halinde organize olmuştur. Yumru ve kök nişastalarda, amorf bölgelerde amiloz yer alırken, kristalimsi bölgeler tamamen amilopektinden oluşmaktadır. Tahıl nişastalarında, amilopektin kristalimsi bölgelerin en önemli bileşenidir. Amiloz ise lipidlerle kompleks oluşturarak zayıf bir kristal yapı oluşturur ve granülün sağlam bir yapıda olmasını sağlar. Nişastanın bu kararlı konfigürasyonu, onun soğuk koşullarda çözünmemesini ve kimyasallar ile amilolitik enzimlere karşı da dirençli hale gelmesini sağlamaktadır (249).

Nişastanın yapısında, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki tür glukoz polimeri bulunur. Doğal nişastanın yaklaşık % 10-30'u amilozdan, % 70-90'ı amilopektinden oluşur. Amilopektin suda çözünürken, amiloz ve nişasta granülü soğuk suda çözünemez. Amiloz ve amilopektin yapıları Şekil 2.7'de görülmektedir. Amiloz, birbirlerine α-1,4 glikozidik bağlarla bağlı, en fazla 6000 D-glukoz biriminden meydana gelen düz zincir şeklinde bir polimerdir. Polimerizasyon derecesi olarak da ifade edilen glukoz birimlerinin sayısı ile amiloz ve amilopektinin nispi içeriği, nişastanın kaynağına göre değişir. Amiloz, suda her

bir dönüşte 6 glukoz monomerinden oluşan bir heliks şekli meydana getirir. Bu kıvrımlı yapı sayesinde iyot molekülü, bu heliksin ortasına girer, nişastanın iyot ile reaksiyonu sonucunda amiloz-iyot kompleksi meydana gelir ve karakteristik mavi-mor renk oluşumu gerçekleşir. Amiloz-iyot kompleksinin bu rengi esas olarak kompleksin yaklaşık 650 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermesinden kaynaklanmaktadır. İyotun, amiloza affinitesi yaklaşık % 20 oranında iken amilopektine % 1'den azdır (26, 29).

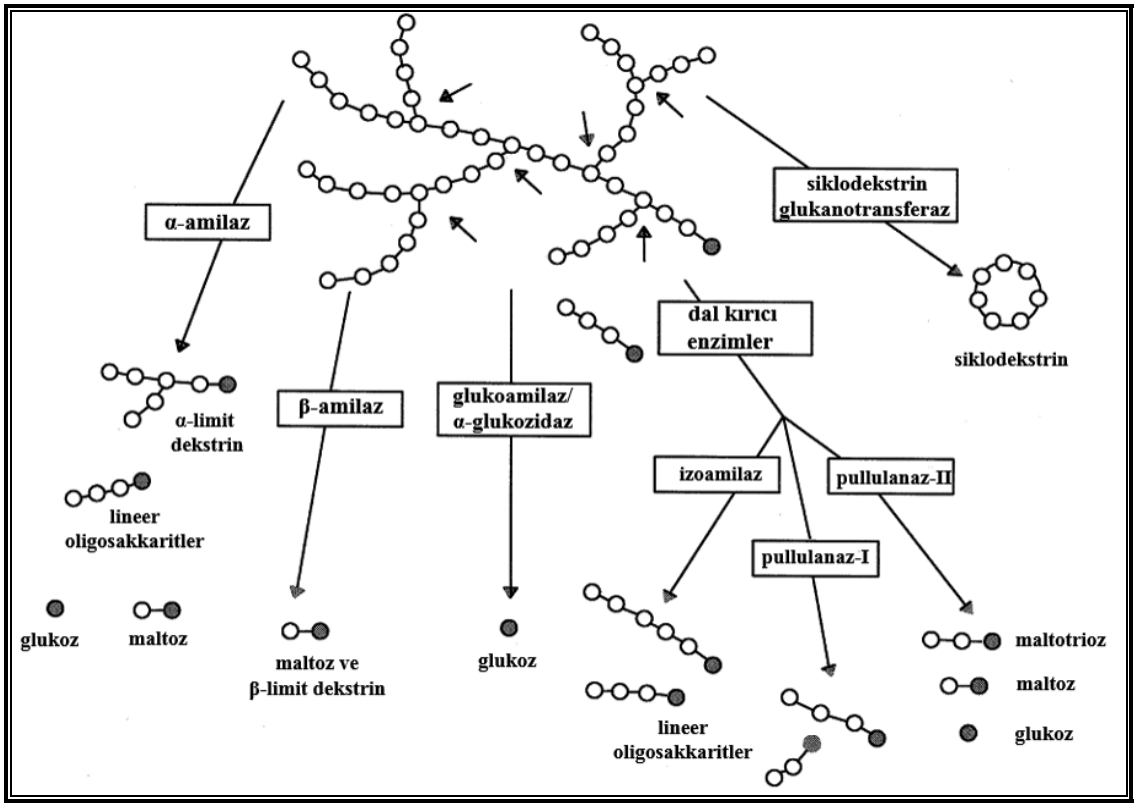


Şekil 2.7. Nişastanın yapısındaki iki glukoz polimeri: (a) amiloz ve (b) amilopektin (250)

Amilopektin, α-1,4 glikozidik bağlı, 10-60 glukoz birimi içeren kısa lineer zincirlerden ve 15-45 glukoz biriminin α-1,6 glikozidik bağlarla bağlandığı yan zincirlerden oluşmaktadır. Bir amilopektin molekülü, her 25-30 glukoz biriminde bir dallanma yapısı göstererek binlerce glukoz biriminden oluşabilir. Amilopektin molekülü, yaklaşık 2 milyon glukoz birimi içerdiğinden doğadaki en kompleks moleküllerden biridir. Amilopektinin sarmal yapısı, zincirinin dallanması ile bozulur ve bu nedenle, amilozun iyot ile reaksiyonu sonucu oluşan koyu mavi-mor renk yerine, amilopektin ile daha az yoğun bir kırmızımsı-mor renk oluşumu gözlenir. İyot-amilopektin kompleksi yaklaşık 540 nm'de maksimum absorbans gösterirler (228).

Nişastanın parçalanması, temel olarak bitki artıklarında ve toprakta bulunan mikroorganizmaların etkisi ile gerçekleşir. Doğal nişasta, suda çözünmediğinden ve hücre içine penetre olamadığından, nişastanın biyolojik olarak parçalanması ekstrasellüler

(hücre-dışı) olarak gerçekleşir. Amilazlar, çoğunlukla besiyeri içerisine salgılanmış ya da hücre zarına bağlı olarak bulunurlar. Belirli bir enzim ile uzun süreli inkübasyon sonucunda nişastanın hemen hemen tüm hidrolizi gerçekleşebilse de, nişastanın etkin hidrolizi, kompleks bir işlem olması nedeniyle birçok enzimin etkisine bağlı olarak gerçekleşir. Endo- ve ekzoamilazların yanı sıra dallanma noktalarına etki eden enzimler ve transferazlar olmak üzere nişasta hidrolizinde görev alan dört enzim grubu bulunmaktadır (Şekil 2.8) (29).



Şekil 2.8. Nişastanın glukozid hidrolaz familyasındaki enzimlerle hidrolizi. (●) indirgeyici α-D-glukoz birimi, (○) indirgeyici olmayan α-D-glukoz birimi. " → " işareti nişasta molekülündeki α-1,6 dallanma noktalarını gösterir (251).

Dallanma noktalarına etki eden enzimler, sadece α-1,6 glikozidik bağlarını hidrolize edebilen, izoamilaz (EC 3.2.1.68) ve pullulanaz tip I (EC 3.2.1.41) enzimleridir. Bu enzimler, özellikle amilopektini parçalayarak uzun lineer polisakkaritler oluştururlar. Ayrıca, α-1,4 ve α-1,6 glikozidik bağlarını hidrolize edebilen pullulanaz enzimleri de bulunmaktadır. Bu enzimler, grup II pullulanaz enzim ailesine ait olup, α-amilaz-pullulanaz ya da amilopullulanaz olarak bilinmektedir. Ana parçalanma ürünleri maltoz ve maltotriozdur. Transferaz enzimleri ise donör molekülün bir α,1-4 glikozidik bağını parçalayarak donörün bir kısmını yeni bir glikozik bağın oluşması ile birlikte bir glikozidik akseptöre transfer ederler. Dallanma gösteren enzim (EC 2.4.1.18) yeni bir α,1-6 glikozidik

bağ oluştururken, amilomaltaz (EC 2.4.1.25) ve siklodekstrin glukanotransferaz (EC 2.4.1.19) gibi enzimler ise yeni bir α-1,4 glikozidik bağ oluştururlar. Siklodekstrin glukanotransferazlar, çok düşük hidrolitik aktiviteye sahiptirler ve 6, 7 ya da 8 glukoz birimli siklik oligosakkaritleri ve oldukça dallanmış yüksek moleküler ağırlıklı dekstrinler olan siklodekstrin glukanotransferaz limit dekstrinleri oluştururlar. Amilomaltazlar, gerçekleştirdikleri enzimatik reaksiyon bakımından siklodekstrin glikoziltransferazlara çok benzerler. Aralarındaki en önemli farklılık; siklodekstrin glukanotransferaz bir siklik ürün verirken, amilomaltazın bir transglikozilasyon reaksiyonu sonucunda lineer bir ürün oluşturmasıdır (Şekil 2.8) (29).

Zincirin uç kısmından itibaren başlayarak parçalanacak bağın nispi konumuna bağlı olarak, nişastanın enzimatik parçalanma ürünleri dekstrin, maltotrioz, maltoz, glukoz, vb. şeklinde olabilir. Dekstrinler, nişasta molekülünün iç kısmındaki glukozidik bağların rastgele hidrolizi sonucu oluşan kısa, kırılmış nişasta segmentleridir. Bir nişasta molekülünün uç kısmından itibaren üçüncü bağın parçalanması ile bir maltotrioz molekülü; eğer ikinci bağ parçalanırsa bir maltoz molekülü ve en sondaki bağın parçalanması ile de bir glukoz molekülü oluşmaktadır (29).

Nişastanın fruktoz ve glukoz şuruplarına dönüştürüldüğü nişasta sıvılaştırma işleminde, nişastanın hidrolizi için kullanılan α-amilazlar, nişasta endüstrisinde en yaygın uygulama alanına sahiptirler. Tüm nişastanın enzimatik dönüşümü, nişasta granüllerinin çözünmesini ve böylece viskoz bir süspansiyon oluşumunu içeren jelatinizasyon; kısmi hidroliz ve vizkozite kaybının gerçekleştiği sıvılaştırma aşaması ve ileri hidroliz ile glukoz ve maltoz gibi basit monosakkaritlerin oluştuğu sakkarifikasyon olmak üzere üç aşamadan oluşur (30, 252). Nişastanın kristal yapısını birarada tutan hidrojen bağlarının parçalanması ve amilolitik enzimlerin erişebilir hale gelebilmesi için nişasta hidrolizinin yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi gerekir. Bu işlemde, nişastanın sıvılaştırılması amacıyla yaklaşık 70-100°C sıcaklıklarda etki edebilen oldukça termostabil bir α-amilazın kullanımı önem taşır. Nişasta ilk olarak sıvılaştırma işlemi esnasında α-amilaz tarafından oligosakkarit ve dekstrin karışımı şeklinde kısmi olarak parçalanır. Sakkarifikasyon işleminde yer alan ikinci enzim, oligosakkaritlerin glukoz monomerlerine parçalanmasından sorumlu olan amiloglukozidaz ya da glukoamilaz enzimidir. Bununla birlikte, nişastada amiloz ve amilopektin yapılarının bulunması nedeniyle pullulanaz enzimine ihtiyaç vardır. Bunun nedeni, amiloglukozidaz enziminin α-1,6 glikozidik bağların parçalanmasında daha yavaş etki göstermesi ve hidroliz reaksiyonunu izomaltoz

ürün oluşumuna kadar gerçekleştirebilmesidir. Pullulanaz, hızlı bir hidroliz reaksiyonu ile α-1,6 glikozidik bağlarını parçalamak için dallanma noktalarına etki eder. Bununla birlikte, amilopullulanaz enzimi nişasta yapısındaki hem α-1,4- hem de α-1,6-glikozidik bağlarını monomerlerine kadar parçalayabildiğinden bu işlemde bu enzimin varlığı avantaj sağlamaktadır (30, 228, 249).

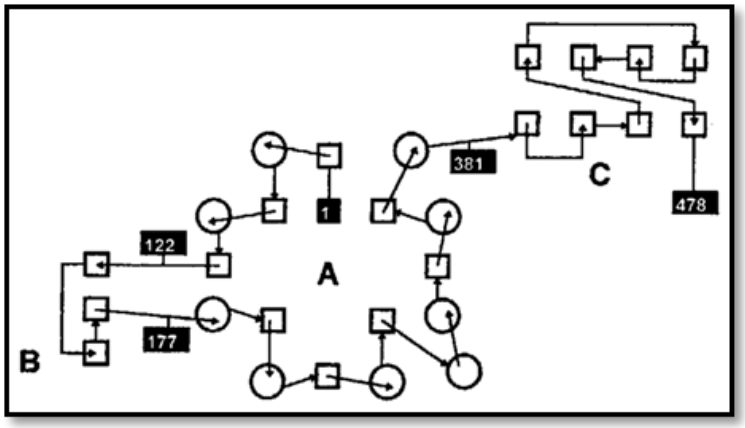
2.4.3. α-AMİLAZLARIN YAPISI VE KATALİTİK MEKANİZMASI

2.4.3.1. Domain Yapısı

GH13 α-amilaz enzim ailesinin üyeleri, $(\beta/\alpha)_8$'li fıçı şeklinde bir katalitik domain (A domaini), β3 ipliği ile A domainin α3 heliksi arasında daha uzun bir loop şeklinde ve fıçı yapısının dışında ilmik oluşturan küçük bir domain (B domaini) ve C-terminal ucunda yer alan C domaini olmak üzere üç domain içeren ve antiparalel β-sandviç katlanma modeli gösteren, tek bir polipeptid zincirli, monomerik ve kalsiyum içeren enzimlerdir (227, 240).

Tüm α-amilaz ailesi enzimlerinde bulunan en korunmuş domain, $(\beta/\alpha)_8$'li fıçı yapısının N-terminal ucunda yer alan A domainidir. Bu domain yapısı, ilk kez *Aspergillus oryzae*'den elde edilen Taka-amilaz A (TAA) enziminde tespit edilmiştir (253). $(\beta/\alpha)_8$'li fıçı şeklindeki domain, sekiz α-heliks tarafından çevrelenmiş bir fıçı yapısı içerisinde yerleşmiş, yüksek oranda simetrik katlanma gösteren sekiz paralel β-ipliğinden oluşmaktadır (Şekil 2.9. ve 2.10a) ve ilk kez trioz-fosfat izomeraz (TIM) yapısında gözlendiği için genellikle TIM-fıçı (TIM-barrel) yapısı olarak bilinmektedir. Her bir β-iplikçiği ve α-heliksi birbirini izler ve loop yapıları ile birbirlerine bağlanırlar (254). Kataliz ve substrat bağlanma reaksiyonlarında rol oynayan korunmuş aminoasit kökleri (örn. *Bacillus licheniformis* α-amilaz [BLA]'ında yer alan Asp231, Glu261 ve Asp328), bu domaindeki β-iplikçiklerinin C-terminalindeki loop bölgelerinde yer almaktadır (227, 228, 244).

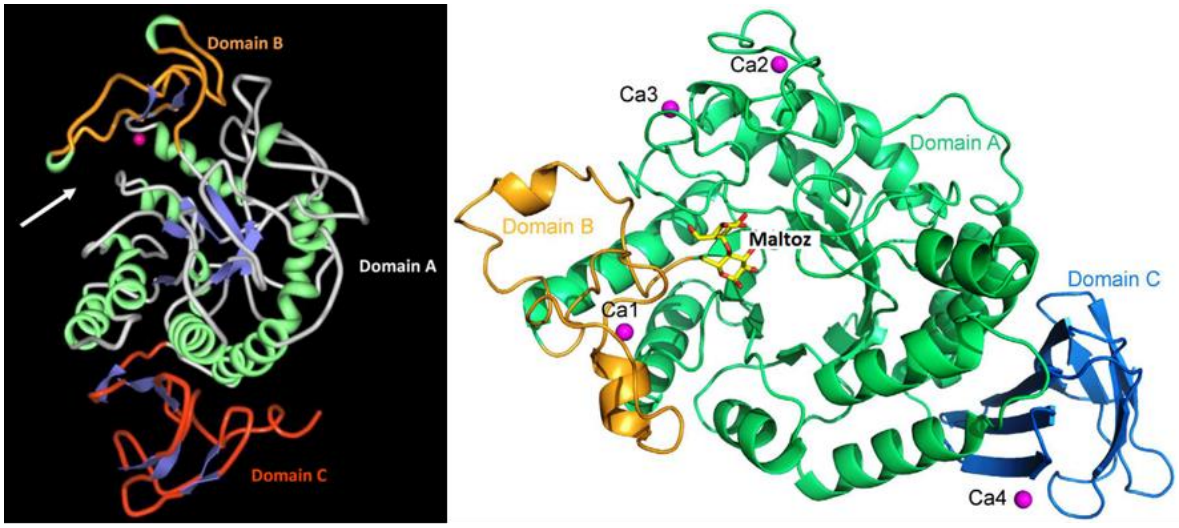
α-Amilaz ailesinin tüm üyelerinde, $(\beta/\alpha)_8$ fıçı yapısının β3 iplikçiği ile A domainin α3 heliksi arasında uzanan uzun bir loop bölgesi bulunur. B domaini olarak adlandırılan bu domain, 44-133 arasında değişen aminoasit kökü içerir ve substrat ya da kalsiyum bağlanmasında rol oynar (228, 255). B domaini, oldukça düzensiz ve β-dizisi bakımından zengin bir yapıya sahiptir ve α-amilazlar arasında çoğunlukla boyut ve yapı bakımından farklılık gösterir (26, 237). B domaini, substrat bağlanma bölgesinin büyük bölümünü oluşturur ve α-amilazlar arasında gözlenen substrat spesifitesindeki farklılıklar açısından önemli olduğu sanılmaktadır (256).



Şekil 2.9. *Aspergillus oryzae* α-amilazı, Taka-amilaz A (TAA)'nın (253) sekonder yapı elemanları. Kareler ve daireler, sırasıyla, β-iplikçik ve α-heliks yapılarını göstermektedir. TAA: A domaini (1-121. aa, 177-380. aa; B domaini (122-176. aa) ve C domaini (384-478. aa) aa: amino asit (257)

C domaini, basit bir polipeptid zinciri ile A domainine bağlanan β-tabakalı bir yapıya sahiptir ve dizinin C-terminal kısmını oluşturur (26, 258). C domainin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, *Bacillus stearothermophilus*'un α-amilazının C-domaini üzerinde gerçekleştirilen mutasyon çalışmaları, bu domainin enzim aktivitesinde rol oynayabileceğini göstermiştir (259). Ayrıca, A domainin hidrofobik kısımlarını çözücüden koruyarak katalitik domaini stabilize ettiği ve substrat bağlanmada da görev aldığı öne sürülmektedir (227, 244). GH13 enzim ailesine ait α-amilazların karakteristik yapısı Şekil 2.10b'de gösterilmiştir.

GH13 enzim ailesinin üyeleri, polipeptid zincirinin her iki ucunda ilave domainler içerebilir. Bu domainlerin görevleri tam olarak bilinmemekle birlikte, genelde nişasta, glikojen ve diğer benzeri sakkaritlerin bağlanmasında görev aldıkları düşünülmektedir (240). α-Amilaz ailesine ait enzimlerin substrat ve ürün spesifiteleri büyük ölçüde değişkenlik gösterir. Bu farklılıkların, katalitik merkeze farklı domainlerin bağlanmasından ya da katalitik bölgenin etrafında ilave şeker-bağlayıcı alt bölgelerin bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (228). Her bir enzimin spesifikliğinin ise büyük çoğunlukla A ve B domainlerinin amino asit kökleri tarafından tanımlandığı düşünülmektedir (244).



(a) (b)

Şekil 2.10. (a) *Aspergillus oryzae* α-amilazı, Taka-amilaz A'nın (PDB ID: 2TAA; 253) üç-boyutlu yapısı. Mavi ve yeşil kısımlar sırasıyla β-iplikçiklerini ve α-heliksleri temsil eder. Okla gösterilen kısım katalitik bölgedir. A-C domainleri, sırasıyla beyaz, sarı ve kırmızı renkle; Ca^{+2}-bağlanma bölgesi pembe renkli daire ile gösterilmiştir (260). (b) GH13 enzim ailesine ait α-amilazların karakteristik yapısı. A, B ve C domainleri sırasıyla yeşil, sarı ve mavi renkle; Ca^{+2} iyonları pembe renkli daireler ile gösterilmiştir. Maltoz, aktif bölgeye bağlanmıştır (261).

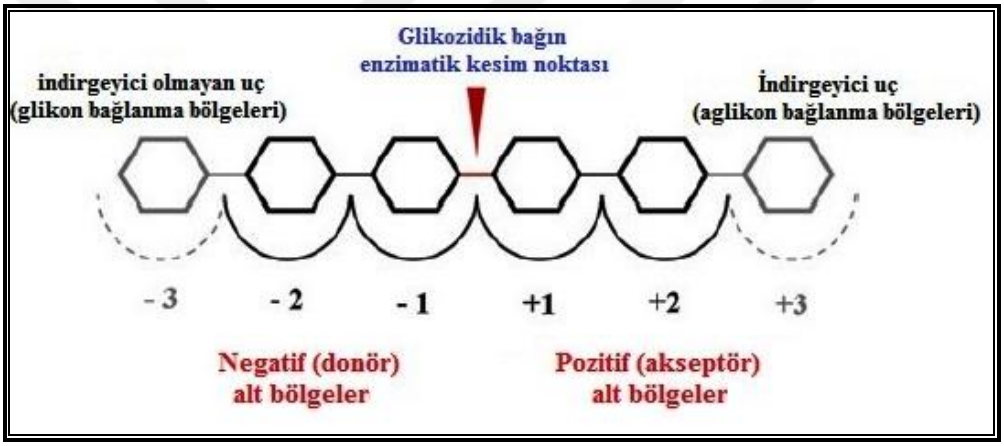
2.4.3.2. Aktif Bölge

Yapısal çalışmalar, α-amilazların aktif bölgesinin (substrat bağlanma bölgesi), polimerik substratların şeker birimleri için çoklu bağlanma bölgelerinden ya da alt birimlerinden oluştuğunu göstermektedir. $(\beta/\alpha)_8$ fıçı yapısında β-iplikçiklerinin C-terminal ucunda, A ve B domainlerinin ara yüzeyinde aktif bölge yarığı yer almaktadır (262). Substrat bağlanma bölgelerinde, çoğunlukla şeker zincirleri ile hidrofobik etkileşimler içerisinde olan aromatik amino asit kökleri bulunmaktadır. Ayrıca, aktif bölgeler substrat ile doğrudan ya da su molekülleri aracılığıyla hidrojen bağları oluşturan birçok dizi içermektedir (227).

α-Amilaz enzimi, substrat molekülünün 4-10 arasında değişen glukoz birimlerini içine alan karakteristik bir substrat bağlanma bölgesine sahiptir. Her bir bağlanma bölgesinin, karbohidrat zincirinin sadece bir glukoz birimine karşı affinitesi bulunmaktadır. Bununla birlikte, oligosakkaritlerin birçok bağlanma bölgesi ile etkileşimleri, uzun substrat moleküllerinin katalitik bölgeye doğru uygun bir şekilde konumlanması sonucunda gerçekleşmektedir. Substrat bağlanma bölgelerinin sayısında ve katalitik bölgelerin lokasyonundaki farklılıklar, substrat spesifitesini, hidroliz sonrası oluşan oligosakkarit fragmentlerinin uzunluğunu ve son ürünün karbohidrat profilini belirlemektedir. İlgili

oligosakkarit zincirinin glukoz birimleri, katalitik bölge dışındaki bir bölgeye bağlanırsa kataliz için uygun substrat bağlanması gerçekleşemez (263).

α-Amilaz ailesine ait bir enzimin aktif bölgesinde, Şekil 2.11'de görüldüğü gibi her biri substratın bir glukoz birimi ile etkileşime girebilen alt bölgeler bulunmaktadır. Bu alt bölgeler, enzim yapısındaki loop bölgelerinde konumlanmış amino asit yan zincirlerinden oluşmaktadır. β-α loop bölgelerinin yapısı, enzimden enzime değişkenlik gösterdiğinden, aktif bölgedeki alt bölgelerin sayısı ve yapısı da değişkenlik göstermektedir. Bu özellik, her bir enzim için karakteristiktir. α-Amilaz ailesine ait farklı enzimler, farklı substratlar üzerine etki ederler ve bu substratların tek ortak özelliği, -1 alt bölgesine bağlanan bir α-bağlı glukoz kökü içermeleridir. Dolayısıyla, bu alt bölgeyi meydana getiren amino asit köklerinde kuvvetli benzerlikler bulunması gerekmektedir (244).



Şekil 2.11. α-Amilaz enzim ailesinin aktif bölgesinde yer alan substrat bağlanma alt bölgeleri. Bir oligosakkaritin indirgeyici olmayan uçtan indirgeyici uca doğru uzanan alt bölgelere bağlanmış olduğu görülmektedir. Enzim kesim reaksiyonu okla belirtildiği gibi -1 ve +1 arasındaki alt bölgeler arasında gerçekleşir (264).

Her bir glukoz birimi, ilgili glukoz birimi için bağlanma alt bölgesi oluşturduğu düşünülen belirli amino asit kökleri tarafından bağlanır (244). Alt bölge kavramı, Davies ve ark. tarafından tanımlanmış olup, bu bölgeler parçalanacak bağın konumuna göre katalitik bölgeden başlanarak numaralandırılmıştır. Alt bölgeler, parçalanacak bağın indirgeyici olmayan ucunda (glikon bağlanma bölgeleri) negatif, indirgeyici ucunda (aglikon bağlanma bölgeleri) ise pozitif olarak numaralandırılırlar (265). α-Amilazlarda, substrattaki parçalanabilir bağın indirgeyici ucunda iki ya da üç alt bölge (+1, +2 ve +3 alt bölgeler) bulunurken, indirgeyici olmayan ucunda iki ile yedi arasında değişen sayıda alt bölge bulunur (Şekil 2.11) (262). α-Amilaz ailesinin farklı enzimleri farklı spesifitelere sahiptir; bazı enzimler glukoz kökleri arasındaki α-1,4 glikozidik bağlarına etki ederken,

bazıları sadece α-1,6 glikozidik bağlarına ve bazıları ise her iki bağa da etki edebilirler. +1 ve +2 alt bölgelerinde substrat bağlanma kısmının yapısı, enzimin spesifitesine göre, özellikle de parçalanan ya da oluşturulan bağın türüne göre (örn. α-1,4 ya da α-1,6 bağı olup olmadığına göre) değişkenlik göstermekle birlikte, tüm enzimler için aktivite substratın bir glukoz biriminin -1 alt bölgesine bağlanması ile gerçekleşir. Bu nedenle, bir enzimin +1 ve +2 alt bölgelerini oluşturan amino asit köklerinin, enzimin spesifitesi ile değişkenlik gösterebileceği düşünülmektedir (244).

2.4.3.3. Korunmuş Dizi Bölgeleri

α-Amilaz ailesine ait enzimlerin amino asit dizileri, korunmuş dizi bölgeleri (CSR-conserved sequence region) olarak adlandırılan birçok kısa diziler içermektedir. Bu dizilerin varlığı, α-amilaz ailesini evrimsel çalışmalar için önemli kılmaktadır. α-Amilaz ailesi içerisinde, $(\beta/\alpha)_8$-fıçı yapısındaki katalitik domainin β4 ve β7 iplikçiklerinde iki aspartik asit ve β5 iplikçiğinde bir glutamik asit olmak üzere korunmuş katalitik üçlü yapı bulunur (örn. Asp206, Glu230 ve Asp297/Taka-amilaz A) (246, 257, 263). Bu bölümde yer alan amino asitler, *A. oryzae* Taka-amilaz A enzim dizisine göre numaralandırılmıştır.

Mevcut veriler ışığında, iki korunmuş aspartik asitten ilkinin (Asp206) katalitik nükleofil, glutamik asit kökünün (Glu230) ise proton donörü olarak görev aldığı kabul edilmektedir. İkinci aspartik asitin (Asp297) rolü hakkında daha az bilgi bulunmakla birlikte, okzokarbonyum iyon-benzeri geçiş durumunun stabilizasyonunda ve ayrıca glutamik asitin aktivite için doğru pozisyonda konumlanmasında görev aldığı öne sürülmektedir (266). α-Amilaz ailesinin dördüncü korunmuş amino asit kökünün, katalitik β4 ipliğindeki katalitik nükleofil olan aspartik asite göre $n-2$ pozisyonunda yer alan arjinin (Arg204) olduğu düşünülmektedir (242). α-Amilaz enzim ailesi üyeleri arasında korunmuş olmayan, ancak substrat bağlanmasında ve enzimin geçiş-durumu stabilizasyonu için önemli olan, fonksiyonel iki histidin kökü (His122 ve His296) sırasıyla β3 ve β7 iplikçiklerinde bulunmaktadır. His122 kökü, GH70 ve GH77 ailelerinde mevcut değildir (32, 244, 263). İlk kez *Thermus aquaticus*'un trehaloz sentaz enziminde yerine glutamik asit (267) gelmiş olsa da, β3 iplikçiğindeki aspartik asit kökü (Asp117) de oldukça iyi korunmuştur (242).

Tipik katalitik üçlü yapıyı oluşturan katalitik nükleofil Asp206, geçiş-durumu stabilizatörü Asp297 ve proton donörü Glu230 köklerinin yanı sıra oldukça korunmuş olan Asp117 ile fonksiyonel histidin kökleri, His122 ve His296, Taka-amilaz A için önemli diziler olarak

kabul edilmişlerdir (253). Bu diziler, tüm α-amilaz ailesinde bulunan 4 temel korunmuş dizi bölgesinde (CSR-I, II, III ve IV), $(\beta/\alpha)_8$-fıçı yapısındaki katalitik domainin sırasıyla β3, β4, β5 ve β7 iplikçiklerinde ya da iplikçiklerin C-terminaline yakın bir yerde konumlanmışlardır. Bu dört korunmuş bölge, α-amilaz ailesinin tanımlanmasında kullanılmıştır (242). α-Amilazlar ve ilişkili enzimlere ait çok sayıdaki amino asit dizilerinin detaylı analizlerine dayanılarak, ilave üç korunmuş dizi bölgesi daha bulunmuştur (243, 257, 268-271). 5. korunmuş dizi bölgesi (CSR-V), kalsiyum bağlayan aspartik asit (Asp175) etrafında B-domaininin C-terminal bölgesine yakın bir yerde bulunur (268, 271). Diğer korunmuş dizi bölgeleri, CSR-VI ve VII, katalitik domainin sırasıyla β2 ve β8 iplikçiğinin C-terminalinde ya da yakınında yer alır ve GH13 enzim üyelerinin birbirlerinden ayrılmasında kullanılabilecek amino asit köklerini içerir (Şekil 2.12) (240).

Kronolojik açıdan bakıldığında; β3, β4 ve β7 iplikçiklerinde bulunan ilk üç korunmuş dizi bölgelerinin (Şekil 2.12'deki CSR-I, II, IV) varlığı, ilk kez Toda ve arkadaşları (1982) tarafından Taka-amilaz A ve domuz pankreatik α-amilazında ortaya konulmuştur. Bir yıl sonra, Friedberg (1983) *Bacillus amyloliquefaciens* α-amilazındaki bölgeleri bulmuş ve son olarak Rogers (1985) arpa α-amilazında korunmuş bölgelerin varlığını tespit etmiştir. Bu nedenle, α-amilaz enzim ailesinin tanımlanmasında kullanılan dört korunmuş dizi bölgelerinden üçünün mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanların α-amilazlarındaki varlığı 1985 yılında bilinmekteydi (272-274). Nakajima ve ark. (1986), farklı kaynaklardan izole edilen (mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar) α-amilazların 11 amino asit dizisinin karşılaştırmalı olarak incelendiği bir çalışma ile β5 iplikçiğinde yer alan dördüncü korunmuş dizi bölgesini (Şekil 2.12'deki CSR-III) tanımlamışlardır (275). Aynı zamanda korunmuş dört dizi bölgesinin tümünün uzunluğu da belirlenmiştir. Bu dört bölge, zamanla diğer nişasta hidrolazlarına ve ilişki enzimlerine ait dizilerin karşılaştırılması yolu ile tanımlanmış ve α-amilaz ailesinin ayırtedilmesinde önemli kriterlerden biri haline gelmiştir (243, 257, 276). CSR-I, II, III ve IV bölgeleri, α-amilaz ailesi üyelerinin katalitik ve substrat bağlanmasından sorumlu amino asit köklerini, CSR-V, VI ve VII ise belirli bir enzim spesifitesi gösteren amino asit köklerini içermektedir (242).

- CSR-I bölgesi, katalitik domainin β3 iplikçiğinde C terminaline yakın olup Asp117, His122 ve Asn121 korunmuş amino asit köklerini içerir. Asp117, CSR-II'deki tamamen korunmuş, değişmeyen Arg204 kökü ile hidrojen bağı oluşturduğundan aktif bölgenin

bütünlüğü için gereklidir. Asn121, A ve B domainleri arasındaki korunmuş kalsiyum iyonunu koordine eden bir Ca^{+2} bağlanma bölgesi olarak bilinmektedir. His122, tüm α-amilaz enzim ailesinde korunmuş olmamakla birlikte substrat bağlanmasında ve enzimin geçiş-durumu stabilizasyonunda önemli rol oynar.

- CSR-II bölgesi, β4 iplikçiğinin C terminaline yakın olup, bu bölgede katalitik aktivite için gerekli olan ve tüm α-amilazlarda bulunan katalitik nükleofil Asp206 ve tamamen korunmuş, değişmeyen Arg204 amino asitleri bulunur. Ayrıca, bu bölgede yer alan His210 kökü, bazı α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferazlarda substrat bağlanmasında görevli olup, kalsiyum bağlanma bölgesi olarak da önemlidir.

- CSR-III bölgesi, β5 iplikçiğinin C terminaline yakın olup, katalitik proton donörü olan Glu230 korunmuş amino asitini içerir.

- CSR-IV bölgesi, β7 iplikçiğinin C terminaline yakın olup, tamamen korunmuş Asp297 ile fonksiyonel His296 köklerini içerir. Asp297 kökünün substrat bağlanmasını ve proton donörü olan Glu230'un pKa'sını arttırdığı öne sürülmektedir. His296 ise CSR-I'deki His122 köküne benzer işleve sahiptir.

- CSR-V bölgesi, B-domainin C terminaline yakın (loop3) olup, Ca^{+2} iyonunun bağlanmasından sorumlu Asp175 amino asitini içerir. Çoğu durumda, Ca^{+2}-bağlayıcı aspartat (Asp 175) ile β4 iplikçiğindeki katalitik aspartat (Asp206) arasında 28-30 amino asit kökü bulunur.

- CSR-VI bölgesi, β2 iplikçiğinde yer alır ve yapısal olarak önemli rol oynayan, korunmuş Gly56 ve Pro64 amino asitlerini içerir. α-Amilazların çoğunda glisin ve prolin kökleri arasındaki amino asit sayısı 7 iken, siklodekstrin glukanotransferaz ve bazı maltooligosakkarit-üretici enzimlerde bu sayı 8'dir. Siklodekstrin glukanotransferazların, α-amilazlardan ayırt edilmesinde CSR'lerdeki bazı özel dizilerin varlığının yanı sıra bu amino asit uzunluğu da önem taşır.

- CSR-VII bölgesi, β8 iplikçiğinde yer alır ve genellikle *n*+2 pozisyonunda bir prolin amino asitini izleyen, yapısal olarak önemli ve oldukça korunmuş bir glisin (Gly323) kökü ile başlar (240, 242, 257, 262).

EC	Yıl	Enzim/Protein	VI β2	I β3	V loop3	II β4 *	III β5 *	IV β7 *	VII β8
GH13 ailesi:									
3. 2. 1. 1	1984	α-Amilaz	56_GFTAIWITP	117_DVVANH	173_LPDLD	202_GLRIDTVKH	226_YCIGEVLD	292_FVENHD	323_GIPIIYAGQ
2. 4. 1. 19	1991	Siklodekstrin glukanotransferaz	70_GVTALWISQ	135_DFAPNH	197_LADFN	225_GIRVDAVKH	253_FTFGEWFL	323_FIDNHD	354_GVPAIYYGT
3. 2. 1. 10	1993	Oligo-1,6-glukozidaz	44_GIDVIWLSP	98_DLVVNH	167_QPDLN	195_GFRMDVINF	251_MTVGEMPG	324_YWNNHD	360_GTPYIYQGE
3. 2. 1. 60	1997	Maltotetraohidrolaz	50_GFSAIWMPV	112_DVVFNH	160_DADLN	189_GFRFDFVRG	215_FCVGELWK	288_FVDNHD	326_GTPVVYWSH
3. 2. 1. 68	1998	İzoamilaz	218_GVTAVEFLP	292_DVVYNH	342_GANFN	371_GFRFDLASV	431_DIFAEPWA	505_FIDVHD	574_GTPLMQGGD
3. 2. 1. 133	1999	Maltojenik amilaz	189_GITGIYLTP	242_DAVFNH	295_MPKLN	324_GWRLDVANE	353_YILGEIWH	419_LLGSHD	451_GSPCIYYGD
3. 2. 1. 133	1999	Maltojenik α-amilaz	65_GVTTIWLSP	127_DFVPNH	196_LADLS	221_GLRIDAVKH	249_FLVGEWYG	321_FIDNHD	352_VRPPIYYGT
3. 2. 1. 141	2000	Maltooligoziltrehaloz hidrolaz	132_GITAIEIMP	187_DVVYNH	220_NFDDA	248_GFRLDAVHA	279_IVIAESDL	372_YIQNHD	409_YIPMIFMGE
2. 4. 1. 4	2001	Amilosükraz	134_GLTYLHLMP	190_DFIFNH	262_QWDLN	290_ILRMDAVAF	332_FFKSEAIV	396_YVRSHD	488_GLPLIYLGD
2. 4. 1. -	2001	Maltoziltransferaz	133_GADAIYLLP	201_DFIPRT	-----	381_GAFLDMGHA	410_VMIAEELD	463_SVETPD	495_SIPYVNTGQ
2. 4. 1. 18	2002	Glukan dallandırıcı enzim	280_GFTHLELLP	335_DWVPGH	-----	401_ALRVDAVAS	454_VTMAEEST	521_LPLSHD	562_GKKLLFMGN
2. 4. 1. 25	2002	4-α-Glukanotransferaz (amilomaltaz)	36_GIDFVNLMP	89_DLPIHH	154_SPDLN	182_GFRFDAAKH	212_IFLAEIWA	272_FTSNHD	306_GVPLVFYGD
3. 2. 1. 54	2002	Siklomaltodekstrinaz	185_GVNAVYFTP	238_DAVFNH	292_MPKLN	321_GWRLDVANE	350_YILGEVWH	416_LLDSHD	448_GTPCIYYGD
3. 2. 1. 135	2003	Neopullulanaz	189_GITGIYLTP	242_DAVFNH	295_MPKLN	324_GWRLDVANE	353_YILGEIWH	419_LLGSHD	451_GSPCIYYGD
5. 4. 99. 11	2003	İzomaltuloz sentaz	86_GIDAIWINP	140_DVVINH	209_QPDLN	237_GMRFDTVAT	291_ATAGEIFG	364_FLDNHD	391_ATPFIYQGS
5. 4. 99. 15	2003	Maltooligoziltrehaloz sentaz	30_GVSHLYLSP	85_DIVPNH	-----	224_GYRIDHIDG	251_IIIVEKIL	438_ATSTHD	579_GIPDFYQGT
3. 2. 1. 98	2004	Maltohekzaohidrolaz	38_GITAVWIPP	102_DVVMNH	203_YADID	232_GFRIDAVKH	262_FAVAEFWK	328_FVDNHD	362_GYPSVFYGD
2. 4. 1 .7	2004	Sükroz fosforilaz	33_VYGDVHILP	83_DAIVNH	160_QIDID	188_YIRLDAVGY	228_EILIEVHS	285_VLDTHD	373_GVPQVYIVG
3. 2. 1. 41	2006	Pullulanaz	458_GVTHVELLP	590_DVVYNH	632_CSDSA	661_GFRFDLMGY	690_YFFGEGWD	817_YVSKHD	859_GIAFDQQGS
3. 2. 1. 20	2008	α-Glukozidaz	52_GVDAIWVCP	106_DLVINH	181_QVDLN	210_GFRIDTAGL	272_MRVGEVAH	344_YIENHD	381_GTLYVYQGQ
3. 2. 1. 70	2008	Dekstranglukozidaz	44_GVMAIWLSP	98_DLVVNH	162_QPDLN	190_GFRMDVIDM	232_LTVGETWG	308_FWNNHD	344_GTPYIYQGE
3. 2. 1. -	2008	Sükroz hidrolaz	119_GVRYLHLLP	175_DFVLNH	248_QWDLN	276_AFRLDSTAY	318_VMKAEAIV	387_YVRCHD	486_GVPLIYMGD
3. 2. 1. 1./41		Amilopullulanaz	434_GVSVIYLNP	487_DGVFNH	562_WANFI	590_GWRLDVENE	619_PMIAENWG	695_LLGSHD	742_GMADIYYGD
3. 2. 1. 93		Trehaloz-6-fosfat hidrolaz	47_QVDVLWLTP	101_DLVVNH	171_QADLN	198_GFRLDVINL	249_MTVGEMSS	323_FWCNHD	359_GTPYIYQGE
3. 2. 1. 116		Maltotriohidrolaz	35_GVSAIWIPQ	119_DIVLNH	172_LLDLP	200_GLRIDAAAH	228_WRVGEVWD	292_FVQNHD	325_GMPMLYRGG
3. 2. 1. -		Maltopentaohidrolaz	31_GFAAVQISP	87_DAVINH	153_LQDLN	181_GLRVDAAKH	212_FWFIEVIG	280_FVDNHD	318_GYPAIMSAT
2. 4. 1. 25/3. 2. 1. 33		Glukan dalkırıcı enzim	137_GYNMIHFTP	198_DVVYNH	-----	505_GVRLDNCHS	534_YVVAELFT	605_MDITHD	642_GYDELVPHQ
5. 4. 99. 16		Trehaloz sentaz	54_GVDCLWVPP	108_DFVMNH	178_QPDLN	206_GFRLDAVPY	248_VLLYEANQ	322_FLRNHD	385_GSPVLYYGD
GH70 ailesi:									
2. 4. 1. 5	2007	Glukansükraz	828_GITDFEMAP	894_DWVPDQ	378_ANDVD	411_SIRVDAVDN	429_VSIVEAWS	521_FARAHD	591_SIPRVYYGD
2. 4. 1. 141		Alternansükraz	1092_GITSFELAP	1169_DWVPDQ	593_ANDID	631_GIRVDAVDN	669_LSILEDWN	762_FVRAHD	834_TVERVYYGD
GH 77 ailesi:									
2. 4. 1. 25	2000	4-α-Glukanotransferaz	40_GGRYWQVLP	213_DMPIFV	262_LYRWD	289_LVRIDHFRG	336_PVLAEDLG	390_YTGTHD	442_SVARLAVYP
HAT*:									
-----	2007	rBAT protein	156_NIKTVWITS	210_DFIPNH	282_QPDLN	310_GFSLDAVKF	370_QYSTEPGR	444_MIGGPD	474_GTPITYYGE
-----		4F2hc antijen	286_KVKGLVLGP	338_DLTPNY	-----	375_GFQVRDIEN	405_RLLIAGTN	465_SLSQ--	493_GTPVFSYGD

Şekil 2.12. α-Amilaz enzim ailesindeki korunmuş dizi bölgeleri. Katalitik üçlü yapı (D-Asp; E-Glu; D-Asp), sarı renkle ve üzerinde yıldız işareti ile gösterilmiştir. α-Amilazın His122, Arg204 ve His296 gibi fonksiyonel olarak diğer önemli amino asit kökleri de sırasıyla kırmızı, mavi ve kırmızı renklerle gösterilmiştir. Çok iyi korunmuş aspartik asit (β3 ipliğinin en başındaki) siyah-beyaz renklerle gösterilmiştir. En az % 50'si korunmuş diziler ise gri renk ile belirtilmiştir. Yıl, enzimin/proteinin üç boyutlu yapısının belirlendiği tarihi göstermektedir. *HAT: Heteromerik amino asit taşıyıcı proteinler (245).

2.4.3.4. Kalsiyum İyonları

Birkaç istisna dışında, bilinen tüm α-amilazlarda A ve B domainleri arasındaki ara yüzeyde sıkıca bağlanmış olarak yer alan, kararlı ve aktif bir enzim için gerekli olduğu bilinen korunmuş bir kalsiyum iyonu bulunmaktadır (26, 28, 277). Korunmuş kalsiyum iyonunun aktif bölgeden kataliz reaksiyonuna doğrudan etki edemeyecek kadar uzakta olması nedeniyle, bu iyonun temelde yapısal bir rolünün olduğu öne sürülmüştür Kalsiyum iyonlarının, α-amilazlar, amilopullulanazlar ve diğer glikozid hidrolazlarda katalitik ve/veya substrat bağlanma bölgelerinin üç boyutlu yapısının korunmasının yanı sıra enzimin termostabilitesinde görev aldığı düşünülmektedir (28, 278). Ca^{+2} iyonlarının aşırı miktarda olması ise inhibitör etkilerini indüklemekte ve reaksiyon verimini düşürmektedir (26, 263). Birçok yapıda bir ya da daha fazla sayıda kalsiyum iyonları tespit edilmiştir. *B. licheniformis* α-amilaz (BLA)'ında bulunan lineer Ca-Na-Ca düzenlemesi buna örnek olarak verilebilir (28). *Bacillus* sp. KR-8104 suşundan izole edilen Ca^{+2} iyonundan bağımsız yeni bir α-amilaz üzerine yapılan bir çalışmada, kalsiyum iyonuna bağımlı iki α-amilaz olan BLA ve BAA (*B. amyloliquefaciens* α-amilaz) enzimleriyle karşılaştırıldığında, Ca^{+2}-bağlanma bölgesinde tek bir amino asit farklılığının bulunduğu ortaya konulmuştur (279).

2.4.3.5. Katalitik Mekanizma

α-Amilazlar, substrat molekülünün iç kısmındaki α-1,4-glikozidik bağların parçalanmasını katalizleyerek substratın moleküler ağırlığında ve viskozitesinde hızlı bir azalmaya neden olurlar (263). α-Glikozidik bağ, oda sıcaklığında yaklaşık 2×10^{-15} s^{-1}'lik spontan bir hidroliz hızına sahip olup oldukça kararlıdır. α-Amilaz ailesinin üyeleri, bu hızı büyük ölçüde arttırabildiklerinden, bilinen en etkili enzimler olarak kabul edilebilirler (29, 228).

Bu endo-etkili enzimler, substratın hidroliz derecesine göre sakkarifiye edici ve sıvılaştırıcı α-amilazlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Sakkarifiye edici α-amilazlar, nişastanın yapısındaki glikozidik bağların yaklaşık % 50-60'ını hidrolizlerken, sıvılaştırıcı α-amilazlar bu bağların yaklaşık % 30-40'ını parçalarlar. Amiloz molekülünün uzun süreli hidrolizi sonucunda, karbohidratın maltoz, maltotrioz ve değişen zincir uzunluklarına sahip oligosakkaritlere dönüşümü gerçekleşir ve bazen maltotriozdan glukozun açığa çıktığı ikinci bir basamağın da oluştuğu gözlenir (263). Bununla birlikte, enzim küçük oligosakkarit moleküllerine etki ettiği zaman reaksiyon hızı düşmektedir. Maltopentoz bazı

α-amilazlar tarafından hidrolizlenen en küçük substrat olduğundan, bu enzimler, örneğin *Pyrococcus furiosus*'dan elde edilenler, glukoz açığa çıkarmazlar. Amilopektinin hidrolizi sonucunda, glukoz, maltoz ve maltooligosakkaritlerin yanı sıra polisakkarit molekülündeki dallanma noktalarından köken alan bir α-1,6-glikozidik bağın çevresinde bulunan dört ya da daha fazla glukoz birimi içeren bir dizi dallanmış α-limit dextrinler açığa çıkmaktadır. Bu enzimlerin katalizledikleri hidroliz sırasında, glikozidik bağların parçalanması ile oluşan hidroksil gruplar α-konfigürasyonlarını korurken, β-amilaz ve glukoamilaz enzimleri anomerik β-konfigürasyonun inversiyonuna neden olmaktadır (257).

α-Amilaz ailesi içerisinde, enzimlerin benzer bir etki mekanizmasına sahip olduklarına ve bu nedenle, tüm enzimlerde katalitik amino asit köklerinin ortak olduğuna inanılmaktadır (276). Substrat ürüne dönüştüğünde anomerik konfigürasyon korunur. Başka bir deyişle, enzimler glukanlar ya da glukozidlerdeki α-bağlarına etki ederek α-bağlı ürünlerin oluşumuna neden olurlar. α-Amilaz ailesinin genel olarak kabul gören katalitik mekanizması, ikili-yer değiştirme mekanizmasıdır (280). Bu mekanizmada, aktif bölgede asit/baz katalizörü olarak bir glutamik asit ve nükleofil olarak bir aspartik asit olmak üzere iki katalitik amino asit kökü yer alır. Üçüncü korunmuş amino asit kökü olan ikinci aspartik asit ise hidrojen bağları ile substratın OH-2 ve OH-3 gruplarına bağlanır ve substratın parçalanmasında rol oynar (266). Diğer korunmuş amino asitler histidin, arginin ve tirozin olabilir. Bunlar, substratın aktif bölgede doğru bir şekilde konumlanmasında, nükleofilin uygun bir şekilde yönlendirilmesinde, geçiş durumunun stabilizasyonunda ve substratın elektrokimyasal yapısının polarizasyonunda rol oynarlar (29, 228).

Katalitik mekanizma beş basamaktan oluşmaktadır:

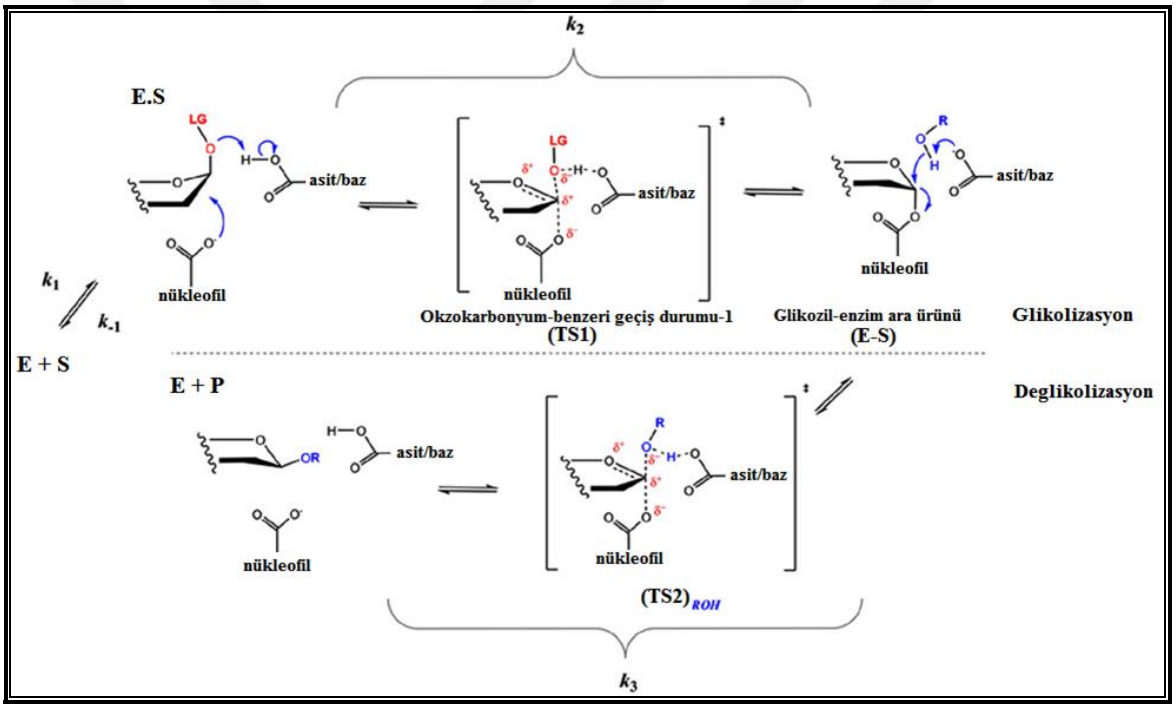
(i) Substrat aktif bölgeye bağlandıktan sonra, asit formundaki glutamik asit glikozidik oksijene (-1 ve +1 alt bölgelerde yer alan iki glukoz molekülü arasındaki oksijen) bir proton verir ve nükleofilik aspartik asit -1 alt bölgedeki glukozun 1. karbon atomuna (C1) bağlanır.

(ii) Bir kovalent ara ürün oluşumunun ardından C1-O bağı parçalanarak bir okzokarbonyum iyonu-benzeri geçiş durumu meydana gelir.

(iii) +1 alt bölgedeki protonlanmış glukoz molekülü aktif bölgeden ayrılır. Aktif bölgeye bir su molekülü ya da yeni bir glukoz molekülü gelir ve -1 alt bölgedeki glukoz molekülü ile aspartik asit arasındaki kovalent bağa bağlanır.

(iv) Reaksiyonun ikinci basamağında, α-anomerik konfigürasyona sahip ürün elde etmek ve orijinal asit grubunun tekrar proton almış hale dönmesi için yeniden bir okzokarbonyum iyonu-benzeri geçiş durumu oluşur.

(v) Baz katalizörü olan glutamik asit, aktif bölgeye yeni gelen su molekülünden ya da +1 alt bölgesine yeni gelen glukoz molekülünden bir hidrojen alır. Su molekülünün ya da +1 alt bölgesine yeni gelen glukoz molekülünün oksijeni, -1 alt bölgedeki glukoz molekülü ile aspartik asit arasındaki okzokarbonyum bağının yerini alır ve böylece -1 alt bölgedeki glukoz molekülünün C1 pozisyonunda yeni bir hidroksil grubu oluşur (hidroliz) ya da -1 ve +1 alt bölgedelerdeki glukoz molekülleri arasında yeni bir glikozidik bağ oluşur (transglikozilasyon) (266). Şekil 2.13'te α-amilaz enzim ailesinin ikili-yer değiştirme katalitik mekanizması görülmektedir (264).



Şekil 2.13. α-Amilaz enzim ailesinin ikili-yer değiştirme katalitik mekanizması. Proton vericisi LG (ayrılan grup), substratı temsil eder (örn. amilazlar için nişasta). Deglikolizasyon reaksiyonu için kovalent glikozil-enzim ara ürünü, bir su molekülü (hidroliz, R=H) ya da bir dış proton alıcısı (transglikolizasyon, R=glukoz, vb.) ile reaksiyona girebilir (264).

2.4.4. MİKROBİYAL α-AMİLAZ KAYNAKLARI

α-Amilazlar, bitkiler ve hayvanların yanı sıra birçok fungus, maya, bakteri, arke ve aktinomiset tarafından da üretilmektedir (27). Endüstriyel üretim için düşük maliyette olmaları, kararlılıkları, üretim için daha az zaman gerektirmeleri, işlem optimizasyonunda

ve modifikasyonunda kolaylık sağlamaları gibi avantajları nedeniyle günümüzde endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak fungal ve bakteriyel kaynaklı α-amilazlar tercih edilmektedir (281). Bakteriler ve funguslar, hücre dışı enzim hidrolizini gerçekleştirmek üzere amilazlarını hücre dışına salgılarlar. Amilaz üretimi için mikroorganizmaların kullanım avantajları; ekonomik üretim kapasiteleri ve mikroorganizmaların istenilen özellikteki enzimlerin elde edilmesi için kolayca manipüle edilebilmeleridir (27, 29).

Birçok biyoteknolojik işlemin yüksek sıcaklık ya da pH koşullarına ihtiyaç göstermesi nedeniyle, endüstriyel uygulamalarda kullanılacak enzimlerin seçiminde biyokatalizörlerin stabilitesi önemli bir kısıtlayıcı faktördür (29). Termofilik mikroorganizmalardan izole edilen enzimler, daha sıkı konformasyona sahip olduklarından, yüksek sıcaklıklarda ve geniş pH aralıklarında kararlılıklarını koruyup aktivite gösterebilirler ve organik çözücülere, proteazlara, deterjanlara ve denatüre edici bileşiklere de daha dayanıklıdırlar. Bu nedenle, biyoteknolojik ve endüstriyel işlemlere daha uygun ve dayanıklı termofilik enzimlerin potansiyel kullanım alanları giderek artmaktadır. Yüksek sıcaklıklardaki endüstriyel işlemlerde mezofilik mikroorganizmaların kontaminasyon riski düşmekte, sıcaklığa bağlı olarak artan aktivasyon enerjisinden dolayı reaksiyon oranları oldukça yükselmekte ve organik bileşiklerin ve substratın çözünürlüğü dolayısıyla da işlem verimi oldukça artmaktadır. Ayrıca, enzimatik reaksiyonlar kimyasal reaksiyonlara göre çok daha hızlı olduğundan, istenilen ürünün sentezi çok daha kısa zamanda ve daha düşük maliyet ile gerçekleştirilmektedir (282).

Bakteriyel α-amilazların üretimi; suş tipi, besiyeri bileşimi, kültüre edilme yöntemi, hücre büyümesi, besin gereksinimleri, inkübasyon periyodu, pH ve sıcaklık, metal iyonları ve termostabilite gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Bakteriler tarafından sentezlenen α-amilazlar, termofilik, termotolerant, alkali ve asidofilik olmak üzere spesifik özellikler gösterebilirler. Yüksek sıcaklıkların nişasta jelatinizasyonunu artırması, besiyerlerinin viskozitesini azaltması, katalitik reaksiyonları hızlandırması, reaksiyon süresini kısaltmaları ve dolayısıyla önemli ölçüde enerji kazanımı sağlamaları, mikrobiyal kontaminasyon riskini en aza indirmeleri, düşük soğutma masrafı, substrat çözünürlüğünde artış ve denatüre edici ajanlar ile proteolitik enzimlere karşı dirençli olmaları bakımından endüstriyel uygulamalar için genellikle termostabil α-amilazlar tercih edilmektedir. Nişastanın enzimatik sıvılaştırılma ve sakkarifikasyon işlemleri 100-110°C gibi yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildiğinden, günümüzde nişasta parçalanmasına ilişkin endüstriyel işlemlerde kullanılma potansiyeline sahip termostabil amilolitik enzimler glukoz, kristalin

dekstroz, dekstroz şurubu, maltoz ve maltodekstrinler gibi ürünlerin üretiminde önemli bir yere sahiptirler. Ayrıca, glukoz şurubu üretimi gibi asidik ya da deterjan endüstrisi gibi alkali tüm endüstriyel uygulamalarda geniş pH aralığında çalışabilen α-amilazlar tercih edilmektedir. Buna karşılık, termolabil (termal olarak değişken) α-amilazlar genellikle ılımlı sıcaklık koşullarında örneğin; bira endüstrisinde alkolün distilasyon işlemlerinde fermentasyon sıvısının hazırlanmasında, hamurun şekil almasında ya da deterjan katkı maddesi olarak kullanımında nişastanın sakkarifikasyonu için kullanılmaktadır. Endüstriyel üretimde α-amilazlarda aranılan diğer bir özellik ise kalsiyumdan bağımsız olunmasıdır (27, 29, 227). Bazı istisnalar dışında, bilinen birçok α-amilazda, kalsiyum iyonunu enzim aktivitesi için önemli kılan korunmuş bir Ca^{+2} bağlanma bölgesi bulunur (277). Fruktoz şurubunun yapımında, Ca^{+2} iyonları işlemin son basamağında kullanılan glukoz izomeraz enzimini inhibe eder ve fermantasyon ve sonraki işlemler üzerinde zararlı etkilere sahip inorganik çökeltilerin oluşmasına neden olabilir. Tüm endüstriyel işlemlerde bu metal iyonlarının ortamdan uzaklaştırılması hem zaman alıcı hem de maliyetli olduğu için, yüksek sıcaklıklarda ortamda Ca^{+2} iyonları olmadan da kararlılığını ve işlevselliğini koruyabilen α-amilazların kullanımı tercih edilmektedir (29). Yapılan bazı çalışmalarla, *Bacillus thermoleovorans*'ın hipertermostabil, son ürün olarak çok miktarda maltoz oluşturan ve kalsiyum iyonundan bağımsız bir α-amilaz ürettiği belirlenmiştir (283, 284).

Bakteriler arasında, yüksek sıcaklıklarda önemli ölçüde kararlılıklarını koruyabilmeleri ve bu enzimler için etkili ekspresyon sistemlerinin varlığı, *Bacillus* türlerini endüstriyel termostabil α-amilaz üretiminde önemli kılmaktadır (26, 30). İyi birer termostabil α-amilaz üreticisi olan *B. subtilis, G. stearothermophilus, B. licheniformis* ve *B. amyloliquefaciens* türleri gıda, fermentasyon, tekstil ve kağıt endüstrileri gibi endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere ticari enzim üretiminde yaygın olarak kullanılırlar (25, 29, 258, 277). *B. licheniformis*'in termostabil α-amilazı dikkate değer bir ısı stabilitesi göstermekte ve proteinlerin termostabilitesinin yapısal temelinin araştırılması için uygun bir model oluşturmaktadır. Diğer α-amilazlarda olduğu gibi, polipeptid zinciri A, B ve C olmak üzere üç farklı domain halinde katlanmıştır. Şu ana kadar yürütülen tüm mutasyon çalışmaları, B domaini içinde ya da sınırında gerçekleştiğinden, enzimin bu bölgesinin termostabilite için önemli olduğu düşünülmektedir. Bu enzimin büyük ölçüde termostabilite göstermesinin artan iyonik etkileşimler, azalmış yüzey alanı ve iç kısımlardaki artan katlanma etkileşimlerinden kaynaklandığı öne sürülmektedir (227). Termofilik *B. licheniformis* α-amilazının termostabilitesinin başlıca nedeninin, birkaç spesifik lizin rezidüsü içeren ilave

tuz köprüleri olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, *B. amyloliquefaciens*'dan elde edilen mutant bir α-amilazın yanı sıra *B. stearothermophilus* α-amilazının iyonik etkileşimler nedeniyle termal denatürasyona karşı oldukça kararlı oldukları öne sürülmüştür (285).

Filamentöz funguslar da uzun yıllardır α-amilaz üretiminde kullanılırlar. α-Amilaz üreten funguslarla ilgili çalışmalar, sadece bazı mezofilik fungus türleri ile sınırlı olup, ticari ölçekte üretim için en iyi fungus suşlarının seçimine ve kültürel koşulların sadece enzim üreticileri için spesifik olmasına yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Ticari öneme sahip hücre-dışı amilaz üreticisi funguslardan bazıları *Aspergillus, Rhizopus, Mucor, Neurospora, Penicillium* ve *Candida*'dır (29).

2.4.5. α-AMİLAZLARIN BİYOTEKNOLOJİK VE ENDÜSTRİYEL UYGULAMA ALANLARI

Dünya enzim üretiminin yaklaşık % 30'nu temsil eden amilazlar, yaygın olarak gıda, deterjan, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi çeşitli endüstriyel alanlarda nişastanın hidrolizi için kullanılırlar. α-Amilazlar, nişastanın fruktoz ve glukoz şuruplarına dönüştürüldüğü nişasta sıvılaştırma işleminde nişastanın hidrolizi amacıyla kullanılırken, işlenmiş-gıda endüstrisinde çoğunlukla ekmek yapımı, bira imalatı, sindirime yardımcı maddelerin, meyve sularının ve nişasta şuruplarının üretiminde kullanılırlar. Özellikle ekmek üretim sektöründe yaygın olarak kullanılan bu enzimler, un içindeki nişastanın daha küçük dekstrinlere parçalanması ve sonrasında bu dekstrinlerin maya ile fermente edilebilmesi için ekmek hamuruna ilave edilebilirler. Ekmek hamuruna α-amilaz eklenmesi, fermentasyon hızının artmasına, hamurun vizkositesinin azalmasına ve dolayısıyla ürün hacminde ve yapısında iyileştirmelere neden olmaktadır (29, 227). Amilazlar, enzimatik deterjan formülasyonunda kullanılan ikinci tip enzimlerdir ve tüm sıvı deterjanların % 90'ı bu enzimleri içerir. Bu enzimler, nişastalı gıda kalıntılarının dekstrinlere ve diğer küçük oligosakkaritlere parçalanması amacıyla çamaşır deterjanlarında kullanılırlar. Amilazlar, deterjan koşullarında kararlılıklarını koruyarak, düşük sıcaklıklarda ve alkali pH değerlerinde aktivite gösterebilirler. Amilazların oksidatif stabiliteleri, yıkama ortamının çok oksitleyici olduğu deterjanlardaki kullanımları için önemli kriterlerden biridir. Deterjan endüstrisinde kullanılan amilazlar çoğunlukla *Bacillus* ya da *Aspergillus* kaynaklıdır. Bununla birlikte, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kaplanmış kağıttaki nişastanın modifikasyonu yani düşük viskoziteli, yüksek moleküler ağırlıklı nişastanın üretiminde ve tekstil üretiminde nişastanın gideriminde (haşıl giderme) de kullanılırlar (26,

28-30). Amilazlar, aynı zamanda çevre kirliliğinin giderimi, nişasta içeren atıkların infiltrasyonu ve biyokimyasal materyal üretimi gibi biyoteknoloji ile ilişkili alanlar da kullanılırlar. Biyoteknolojideki yeni gelişmelerle birlikte, amilaz uygulamaları klinik, farmasötik ve analitik kimya gibi diğer birçok alana yayılmıştır. Endüstriyel olarak üretilen ilk enzim, 1984 yılında fungal kaynaktan izole edilen bir amilaz olup, sindirim sistemi rahatsızlıklarının tedavisinde farmasötik bir yardımcı olarak kullanılmıştır (30).

2.4.6. *ANOXYBACILLUS* TÜRLERİNDEN α-AMİLAZ GENİNİN İZOLASYONUNA YÖNELİK YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR

Chai ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, Malezya'daki iki farklı sıcak su kaynağından izole edilmiş ve amilolitik aktiviteye sahip oldukları kalitatif olarak tespit edilmiş iki *Anoxybacillus* suşunda (SK3-4 ve DT3-1), iki yeni termostabil ve alkalitolerant α-amilaz enziminin biyokimyasal özellikleri ve protein dizileri incelenmiştir. Bu çalışma ile *Anoxybacillus* suşlarından elde edilmiş α-amilaz enzimini kodlayan iki gen ilk kez *E. coli*'de klonlanmış ve ifade edilmiştir. 1.518 bç uzunluğundaki α-amilaz gen dizilerinin birbirine % 98.0 oranında benzer, diğer bilinen α-amilaz genlerinden ise farklı oldukları tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, yakın ilişkili *Anoxybacillus* izolatları arasındaki α-amilaz gen varyasyonlarının aydınlatılması yönündeki diğer çalışmalar için tek önemli kaynaktır (18).

Literatür bilgileri ışığı altında, *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin iyi birer termostabil amilaz üreticisi oldukları bilinmesine rağmen, amilaz genlerinin dizileri, amilazların izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu hakkında sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır. Bu tez çalışması, endüstriyel anlamda önemli olabilecek *Anoxybacillus* cinsi termostabil amilaz üreticisi yeni izolat ve tip suşların gen kaynaklarının belirlenmesini sağlayarak yeni araştırma konularının önünü açabilecektir.

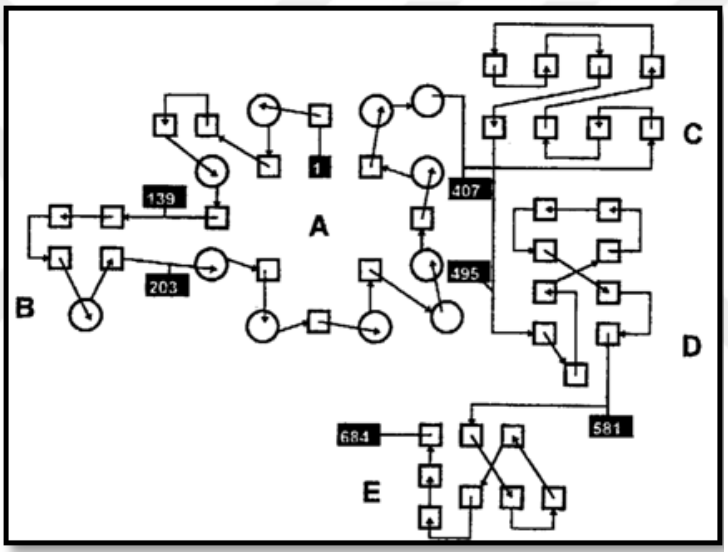
2.4.7. SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZLAR

2.4.7.1. Siklodekstrin Glukanotransferazların Yapısı

Siklodekstrin glikoziltransferaz, siklomaltodekstrin glukanotransferaz ve siklomaltodekstrin glikoziltransferaz olarak da bilinen siklodekstrin glukanotransferaz (CGTaz) (EC 2.4.1.19), nişasta ve ilgili α-glukanlara etki eden glikozid hidrolaz 13 enzim ailesinin bir üyesidir (235, 276). 1991 yılında *Bacillus circulans*'tan CGTaz'ın ilk yapısal

modeli elde edildiğinde, CGTaz'ların yapısı ve mekanizması hakkında daha ayrıntılı bilgi edinilmiştir (286). Son 20 yılda 51 farklı CGTaz enziminin kristal yapısı aydınlatılmıştır. Bu üç boyutlu yapılar, CGTaz'ların mekanizması ve doğrudan moleküler mühendisliği üzerine daha ileri araştırmalar için bir temel oluşturmaktadır (287).

Kristalize edilmiş tüm CGTaz'lar çoğunlukla bakterilerden izole edilmiş olup, spesifik olarak 24'ü *B. circulans*'tan, 11'i *Bacillus* sp.'den, 1'i *Bacillus clarkii*'den, 3'ü *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*'ten, 2'si *Paenibacillus macerans*'ten ve 1'i *G. stearothermophilus*'tan elde edilmiştir (http://www.rcsb.org; 288). Bu kaynaklardan elde edilen CGTaz'ların 3 boyutlu yapıları oldukça benzerdir (> % 60) ve her biri A, B, C, D ve E olmak üzere 5 domain yapısına sahiptir (Şekil 2.14) (286, 289).



Şekil 2.14. *Bacillus circulans* 8 suşunun siklodekstrin glukanotransferazının (286) sekonder yapı elemanları. Kareler ve daireler sırasıyla β-iplikçik ve α-heliks yapılarını göstermektedir. *B. circulans* 8 CGTaz: A domaini (1-138. aa; 203-406. aa); B domaini (139-202. aa); C domaini (407-494. aa); D domaini (495-581. aa) ve E domaini (581-684. aa) (aa:amino asit) (257)

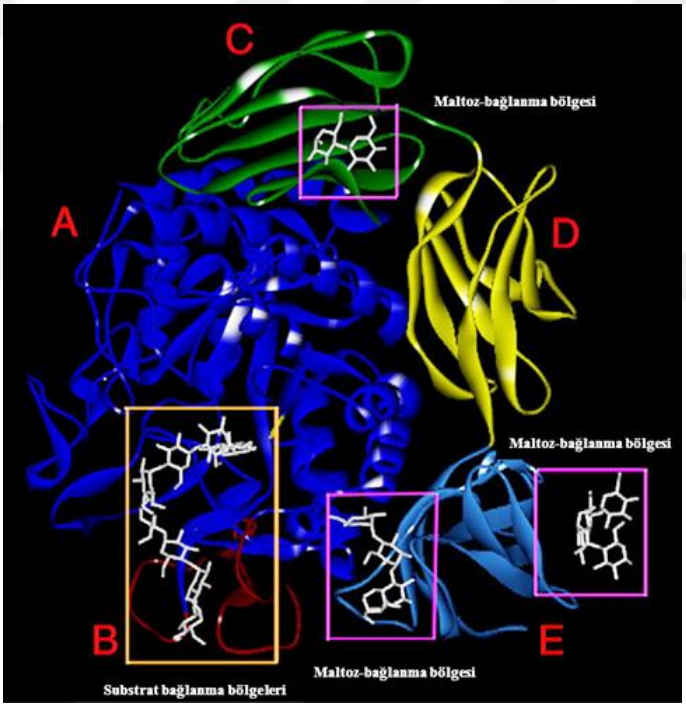
A domaini, bir $(\beta/\alpha)_8$ ya da TIM-fıçı yapısı gösteren katalitik domain olup α-amilaz ailesinin tüm enzimlerinde bulunur (269). A domaindeki β-ipliklerinin karboksil ucunda katalitik aktivitede ve substrat bağlanmasında önemli rol oynayan korunmuş amino asit kökleri bulunur. B domaini, A domainin β3 tabakası ile α3 heliksi arasında dışa doğru çıkıntılı bir loop bölgesidir ve substrat bağlanmasında önemli rol oynayan 44-133 amino asit kökünden oluşur (32). Goh ve ark. (2012), B domainin protein yüzeyine yeni bir tuz köprüsü ekleyerek CGTaz'ın stabilitesini önemli ölçüde etkileyebilecek A/B domain arayüzünde bir kalsiyum-bağlanma bölgesinin varlığını bildirmişlerdir (290). Benzer

şekilde, Leemhuis ve ark. (2004) B domainindeki amino asit köklerini değiştirerek ve bir tuz köprüsü ekleyerek *B. circulans* CGTaz'ının termostabilitesini artırmışlardır (291). Yine Goh ve ark. (2012) tarafından farklı CGTazlar arasında B domainlerinin değişimi ile B domaininin enzim termostabilitesini etkilediği doğrulanmıştır (292). CGTaz'ların C-terminal bölgesinde β-tabaka yapısına sahip C, D ve E domainleri bulunur (Şekil 2.15). C domaini, yaklaşık 100 amino asit uzunluğunda olup substrat bağlanmasında görev alan bir maltoz bağlanma bölgesi içerir (293). Yaklaşık 90 amino asitten oluşan ve çoğunlukla CGTaz'larda bulunduğu bildirilen D domainin fonksiyonu ise henüz bilinmemektedir (287).

Yaklaşık 110 amino asitten oluşan E domaini, ham nişasta-bağlanma domaini olarak bilinmektedir (293-295). E domaini, granüler nişastanın bağlanmasında görevli karbohidrat bağlanma modülü 20 (CBM20-Carbohydrate-Binding Module Family 20) ailesi olarak sınıflandırılmıştır (233, 296). Birçok amilaz ve CGTaz'ların E-domaini ile glukoamilazların ham nişasta bağlanma domaini arasındaki dizi karşılaştırılmaları, çeşitli nişasta-parçalayıcı enzimlerde bu domainin varlığını ortaya koymuştur (297). Daha sonra, CGTaz'larda aktif bölgeden ayrı olarak bir nişasta bağlanma bölgesinin bulunduğu gösterilmiş (298) ve *B. macerans* CGTaz'ına ait E-domainin β-galaktozidaza bağlanması ile bu domainin bir nişasta bağlanma domaini gibi fonksiyon gösterebileceği bulunmuştur (294). *B. circulans* 251 (BC251) şusunun CGTaz'ı üzerinde yapılan çalışmalar, E-domainin fonksiyonu hakkında daha detaylı bilgi vermiştir (299). Protein yüzeyinde 3 maltoz bağlanma bölgesi (MBS-maltose binding site) olduğu belirlenmiştir. İlk iki maltoz bağlanma bölgesi (MBS1 ve MBS2) E domaininde, diğeri (MBS3) ise C domaininde yer alır. Maltozun MBS1 bölgesine bağlanması her iki glikoz halkasının Trp616 ve Trp662 amino asit köklerinin indol grupları ile hidrofobik etkileşimi sonucu gerçekleşir. Maltozun indirgeyici glukoz birimi MBS2 bölgesinde Tyr633'ün fenil halkası üzerinden, MBS3 bölgesinde ise Trp413'ün aromatik yan zincirinden bağlanmaktadır (289). MBS1 ve MBS3 bölgelerinin, ham nişasta bağlanmasında önemli rol oynadığı, MBS2'nin ise lineer nişasta zincirlerinin aktif bölgeye taşınmasında görev aldığını belirlenmiştir (293). Ayrıca, MBS1 bölgesinin siklizasyon reaksiyonunda rol oynadığı öne sürülmektedir (300).

Belirli α-amilazlar 3 kalsiyum bağlanma ve 1 sodyum bağlanma bölgesi içerirken, CGTaz'ların çoğu A domainde ve A/B domain arayüzeyinde yer alan ve stabilite ve katalitik aktivite için önemli olan 2 kalsiyum bağlanma bölgesine sahiptir (290). *B. circulans* 251 suşunun CGTaz'ında 2 ayrı kalsiyum bağlanma bölgesi tespit edilmiştir. *B.*

circulans 251 CGTaz'ındaki 1. kalsiyum bağlanma bölgesinin yapısı, *B. circulans* 8 CGTaz'ı ile *A. oryzae* ve *A. niger* amilazlarının yapıları ile benzer homoloji göstermiştir. B domainde yer alan Ile190 ve Asp199 ile A domaindeki Asn139 ve His233 amino asit kökleri ilk kalsiyum bağlanma bölgesindeki kalsiyum iyonu ile etkileşime girmektedir (289). Ile190 kökü, BC251 CGTaz'ının termostabilitesi için önemli olduğu gösterilmiş olan 185-TTENGIYK-192 dizi motifinde yer almaktadır (291). Amilazlarla yapısal homoloji göstermeyen 2. kalsiyum bağlanma bölgesi ise A domainin β1 ipliği ve α1 heliksi ile bağlantılı loop bölgesinde bulunur. Bu bölgede kalsiyum ile etkileşime giren amino asit köklerinin Asp27, Asn29, Asn32, Asn33 ve Asp53 olduğu belirlenmiştir (289). *B. circulans* 8 suşunun CGTaz'ındaki 2. kalsiyum bağlanma bölgesinde bu amino asit köklerine ek olarak Gly51 kökünün varlığı bildirilmiştir (286).



Şekil 2.15. *Bacillus circulans* 251 siklodekstrin glukanotransferaz enziminin üç boyutlu yapısı (PDB ID: 1CXK; 266)

2.4.7.2. Siklodekstrin Glukanotransferazların Katalizlediği Reaksiyonlar

Glikozid hidrolaz 13 enzim ailesinin diğer üyeleri gibi CGTaz'lar da nişasta molekülündeki α-glikozidik bağlara etki ederek α-anomerik mono- veya oligosakkaritlerin oluştuğu hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler. Ancak, α-amilazların aksine CGTaz'ların hidroliz aktivitelerinin düşük olduğu bildirilmiştir. CGTaz'lar, nişasta moleküllerinin indirgen olmayan uçlarından parçalayan ekzoenzimler olup nişastaya etki ettiklerinde oluşan ana ürünler ise siklodekstrinler ve oldukça dallanmış yüksek moleküler ağırlıklı

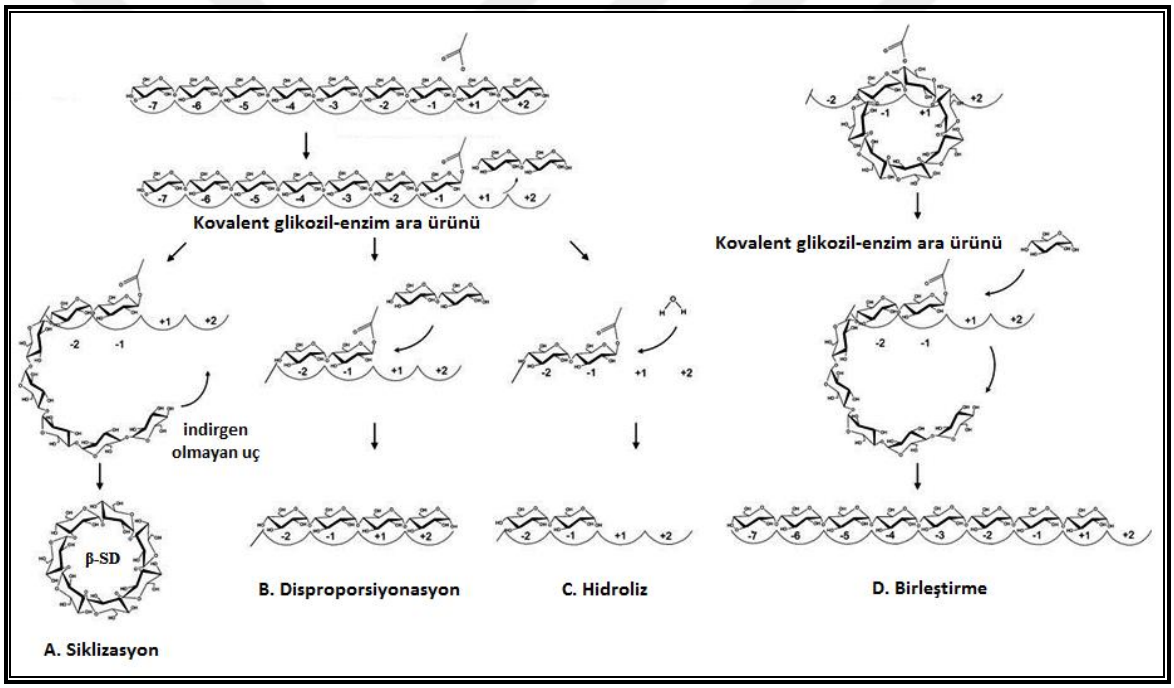
dekstrinlerdir (siklodekstrin glukanotransferaz limit dekstrinler) (32). Genel olarak, CGTaz tarafından katalizlenen reaksiyonlarda lineer bir oligosakkarit molekülünün CGTaz'ın substrat bağlanma alt bölgelerine bağlanması ile α-glukanların -1 ve + 1 alt bölgeleri arasındaki glikozidik bağlar parçalanır ve donör alt bölgelerine kovalent olarak bağlanan kararlı bir glikozil-enzim ara ürünü oluşur. Reaksiyonun ikinci basamağında kovalent bağlı glikozil-enzim ara ürünü bir akseptör molekülüne transfer edilir (301, 302).

CGTaz'lar temel olarak hidrolizin yanı sıra siklizasyon, disproporsiyonasyon ve birleştirme olmak üzere üç transglikolizasyon reaksiyonunu katalizlerler (Şekil 2.16). CGTaz'lar için spesifik olan siklizasyon reaksiyonunda, glikozil-enzim ara ürünü akseptör molekülü olarak aynı oligosakkarit zincirinin indirgen olmayan ucundaki 4-hidroksil grubuna transfer edilir ve α-(1,4)-bağlı siklik oligosakkarit olan bir siklodekstrin molekülü oluşur. CGTaz'lar kovalent bağlı glikozil-enzim ara ürünü akseptör olarak bir su molekülüne (hidroliz) ya da lineer bir ürün oluşumu için ikinci bir oligosakkarit molekülüne (disproporsiyonasyon) transfer edebilirler. Bununla birlikte, CGTaz'lar bir siklodekstrin halkasının α-glikozidik bağının parçalanması ile oluşan lineer siklodekstrinin diğer bir akseptör şekere aktarılması sonucunda lineer bir oligosakkaritin üretildiği birleştirme (coupling) reaksiyonu ile siklodekstrinleri de parçalayabilirler. Birleştirme reaksiyonu siklizasyon reaksiyonunun tersi olarak da bilinmektedir (303, 304).

+1 ve +2 alt bölgeleri, glukoz halkasını fenil halkalar ile stabilize eder (266, 305) ve -1 alt bölgesi CGTaz'ın kataliz merkezini oluşturur (306). -2 ve -3 alt bölgelerindeki amino asit kökleri CGTaz'ın 4 reaksiyonu (siklizasyon, disproporsiyonasyon, birleştirme ve hidroliz) üzerinde önemli etkilere sahiptir (307, 308). -3 ve -7 alt bölgelerinin siklodekstrin ürün spesifitesi için önemli olduğu gösterilmiştir (301, 304). -6 ve -7 alt bölgeleri substratı bağlar (309). -4 ve -5 alt bölümlerinin işlevlerini bildiren ise az sayıda çalışma bulunmaktadır (310).

Biyokatalizör olarak, CGTaz'ların katalizledikleri dört reaksiyon ile ilişkili çok sayıda uygulama alanı bulunmaktadır. Temelde siklodekstrinlerin üretiminde kullanılırlar. Siklodekstrin glukanotransferazlar, aslında nişasta molekülünden, 6, 7 veya 8 glukoz ünitesinden oluşan ve siklodekstrin (SD) adlı siklik D-glikozil birimleri oluşturabilen tek enzim grubudur (31). Farklı siklodekstrin spesifitesine göre, CGTaz'lar sırasıyla α-, β- ve γ-CGTaz (α-SD [SD6], β-SD [SD7] ya da γ-SD [SD8]), olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar. Siklodekstrin glukanotransferazların son ürünü olan siklodekstrinler, ortamdaki

molekülleri sararak bir inklüzyon kompleksi oluştururlar. Bu kompleksler, ortamdaki molekülleri çevreleyerek, moleküllerin fizikokimyasal özelliklerinde değişiklere neden olurlar. Bu özellikler arasında; çözünürlük artışı, fiziksel faktörlere karşı molekülün stabilizasyonu, süblimasyonun ve uçuculuğun kontrolü, istenmeyen koku ve tatların maskelenerek modifikasyonu, kontamine bileşiklerin fiziksel olarak ayrılması gelmektedir. Bu nedenle siklodekstrinler; gıda, eczacılık, kozmetik, çevre, paketleme, biyodönüşüm ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır (311). CGTaz'lar SD üretiminin yanı sıra transglikozilasyon yoluyla çözünürlük ve kararlılık gibi karbohidrat özelliklerinin iyileştirilmesi, acının hafifletilmesi, bifidojenik karakteristiklerin arttırılması, sitotoksisitenin azaltılması ve raf ömrünün arttırılması gibi bazı uygulamalarda önemli rol oynarlar (287).



Şekil 2.16. Siklodekstrin glukanotransferazların katalizlediği reaksiyonların şematik gösterimi. Kovalent bağlı oligosakkarite transfer edilen akseptör moleküllerinin yapısı enzim reaksiyonunun spesifitesini belirlemektedir (301, 312).

2.4.7.3. Mikrobiyal Siklodekstrin Glukanotransferaz Kaynakları

CGTaz enzimleri çoğunlukla bakteriler tarafından üretilmekte olup, bu enzim ilk olarak *Bacillus macerans*'tan elde edilmiş (313) ve *B. macerans*'taki ilk CGTaz geni ise 1986 yılında Takano ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (314). Daha sonra, çeşitli kaynaklardan, özellikle *Bacillus, Paenibacillus, Geobacillus, Klebsiella, Thermoanaerobacterium* ve *Thermoanaerobacter* cinsi bakterilerden de CGTaz'lar elde

edilmiştir (315). Bunlara ek olarak, Abelian ve ark. (1995) *Actinomycetes* türlerinden CGTaz izole etmişlerdir (316). Ayrıca, *Thermococcus* ve *Pyrococcus* cinslerine ait çeşitli arke türlerinin de CGTaz ürettikleri bilinmektedir. Günümüzde, endüstriyel CGTaz üretiminde en çok aerobik ve alkalifilik *Bacillus* cinsi bakteriler kullanılmaktadır (287).

Chung ve ark. (1998), 2000 yılından sonra *Geobacillus* cinsine dahil edilen *B. stearothermophilus* ET1 suşundan termostabil bir CGTaz enzimi izole etmişler ve *E. coli*'de klonlanan CGTaz geninin nükleotid ve amino asit dizilerinin, diğer *B. stearothermophilus* suşlarının CGTaz genleri ile sırasıyla % 84 ve % 88 benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir (317). Son zamanlarda farklı kaynaklardan bazı yeni CGTaz enzimleri de elde edilmiştir. Go ve ark. (2007), alkalifilik *Bacillus* sp. BL-31 suşundan biyoflavonoidlerin molekül içi transglikolizasyonuna yüksek oranda spesifite gösteren yeni bir β-CGTaz izole etmişlerdir (318). Yapılan bir çalışmada, *Bacillus pseudalcaliphilus* 8SB (319) suşundan nişastayı β-SD ve γ-SD'ye dönüştüren ve yüksek üretim etkinliğine sahip yeni bir termostabil, alkali CGTaz enzimi elde edilmiştir (320). Petrova ve ark. (2012), aynı zamanda, alkalifilik halotolerant *Bacillus pseudalcaliphilus* 8SB suşundan yeni bir cgt geni izole edip dizilemişler ve bu gen dizisinin diğer *Bacillus* CGTaz'ların nükleotid dizileri ile düşük homoloji (< % 82) gösterdiğini tespit etmişlerdir (321). Yenpetch ve ark. (2011), *Paenibacillus* sp. RB01 suşundan yeni bir CGTaz enzimi izole etmişler ve rekombinant enzim aynı boyutta ancak farklı yüklere sahip 3 izoform (I, II ve III) göstermiştir; bu durum kararsız asparajin amino asit köklerinin deaminasyonunun CGTaz'ların moleküler biçimlerini değiştirdiğini ortaya koymuştur (322). Ibrahim ve ark. (2012) tarafından aşırı tuzlu soda göllerinden (Wadi Natrun Vadisi, Mısır) izole edilen alkalifilik *Amphibacillus* sp. NPST-10 suşundan geniş bir pH aralığında (5.0-11.0) aktivite gösteren yeni bir CGTaz elde edilmiştir (323).

Termostabil siklomaltodekstrin glukanotransferazlardan en iyi bilinenleri, *Anoxybacillus* sp. B2M1 (CP015435.1:784808-786943), *Anoxybacillus* sp. B7M1 (B7M1 CP015436.1:c859160-857025), *Bacillus stearothermophilus* ET1-bscgt (317) ve *B. stearothermophilus* NO2-cgt232 (324) türlerine ait gen dizilemesi yapılan enzimlerdir. *Anoxybacillus*'lara özgü siklodekstrin glukanotransferazlar ile ilgili çok kısıtlı bilgiye sahip olunup, sadece *Anoxybacillus* sp. B2M1 ve B7M1 kodlu iki izolatın tüm genom dizilemesinden elde edilen annotasyon çalışmaları sonucunda siklomaltodekstrin glukanotransferaz ürettikleri bilinmekte, ancak bu bakterilerdeki enzimin aktivitesi veya karakterizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (33, 93).

2.4.7.4. Siklodekstrin Glukanotransferazlardaki Dizi Benzerlikleri

Genel olarak, CGTaz'ların aminoasit dizileri bakımından % 47-99 arasında değişen net bir benzerlik göstermeleri, α-amilaz ve CGTaz katalizindeki farklılıklardan sorumlu amino asit köklerinin tanımlanmasına imkan sağlamaktadır (32). CGTaz'lara özgü ve tamamen korunmuş ilk spesifik amino asit kökleri, A domainin β1 ipliği ve α1 heliksi arasında yer alan 27DG ve 32NNPXG dizi motifleri ile 46L ve 53D amino asitleridir (bu bölümdeki amino asit pozisyonları, aksi belirtilmedikçe, *Bacillus circulans* 251 CGTaz enzim dizisine göre numaralandırılmıştır). Bu amino asit köklerinden sadece Pro34, *Klebsiella pneumoniae*'nın CGTaz'ında bulunmaz ve bu nedenle tamamen korunmuş değildir. Asp27, Asn29, Asn32, Asn33 ve Asp53 α-amilazlarda yer almayıp, sadece CGTaz'larda bulunan ve bir kalsiyum bağlanma bölgesinin ligandlarını oluşturan amino asit kökleridir (286, 289). Gly28, Pro34 ve Gly36'nın bu kalsiyum bağlanma bölgesi için yapısal destek görevi gördükleri düşünülmektedir. Leu46 kökü kalsiyum bağlanmasında etkin olmamakla birlikte, yanındaki 47. amino asit kökü CGTaz'larda (semi)siklik oligosakkaritlerin bağlanmasında rol oynayan tipik olarak bir arjinin, lizin ya da histidin amino asitidir (32).

CGTaz'lara özgü amino asit kökleri en çok B domainde yer alır: Phe136 (*K. pneumoniae*'da tirozin), Phe/Tyr151, Glu153, Gly165 (*K. pneumoniae*'da treonin, α-amilazlarda tipik olarak bir aromatik amino asit), Tyr167, Phe175 (*K. pneumoniae*'da tirozin), His177, Gly180 ve 192-K/R, N, L, F/Y, D-196 dizi motifi (bunlardan sadece Leu194 α-amilazlarda da bulunur). Ile190 ve Tyr191 amino asit kökleri de *K. pneumoniae*'nın CGTaz'ı dışında tüm CGTaz'larda korunmuştur (32). Tyr191, B ve D domainleri arasında bir bağlantı kurar (325). Phe195, CGTaz'ın aktif bölgesinin merkezinde yer alır ve bu nedenle karbohidrat kökleri ile hidrofobik ekileşime girerek indirgen olmayan uç kısmını bağlı bulunan oligosakkaritin indirgen ucuna doğru bükülmesinde ve sonuçta siklodekstrin oluşumunda rol oynadığı öne sürülmektedir. Bu bölgedeki mutasyonlar, Phe195 kökünün siklizasyon reaksiyonu için önemli olduğunu göstermiştir (324, 326-328). Bununla birlikte, Tyr195Gly mutasyonları sonucunda siklizasyon aktivitesinin % 10-25'i korunmuş ve bu durum Tyr/Phe195 kökünün aromatik karakterinin bu reaksiyon için çok da önemli olmadığına işaret etmiştir. Tyr195'in suyu aktif bölgeden uzaklaştırarak hidrolizi önlemede rol oynadığı da düşünülmektedir (326).

A domainin ikinci kısmında, Tyr210, Trp218, Ile226 ve Trp258 olmak üzere kısmen daha az sayıda CGTaz-spesifik amino asit kökü bulunmaktadır. Trp258, katalitik Glu257

kökünün yanında yer alır ve α-amilazlarda ise burada genellikle alanin, valin, izolösin ya da lösin gibi bir hidrofobik bir amino asit bulunur. *B. stearothermophilus* NO2 suşunda bu triptofan amino asitinde yapılan mutasyon çalışmaları, siklizasyon aktivitesinde oldukça azalmaya neden olurken hidroliz aktivitesini neredeyse hiç etkilememiştir (324).

CGTazlar için yaklaşık 25 benzersiz ya da benzersiz şekilde korunmuş amino asit kökü tanımlanmış olup, bu korunmuş bölgelerden sadece Tyr/Phe195 ve Trp258'in CGTaz'ın katalizlediği siklizasyon reaksiyonunda yer aldığı gösterilmiştir. Ancak, bu hidrofobik amino asitlerin reaksiyondaki mekanik rolleri henüz aydınlatılmamıştır (303).

2.4.7.5. Siklodekstrin Glukanotransferazları α-Amilazlardan Ayıran Karakteristik Dizi Farklılıkları

Siklodekstrin glukanotransferazlar dizilerinde, α-amilazlardan farklı olarak korunmuş dizi bölgelerinde tespit edilen ve CGTaz'lar için karakteristik olan amino asit kökleri aşağıda verilmiştir (Şekil 2.17). Bu bölümde, siklodekstrin glukanotransferazlardaki amino asit pozisyonları *B. circulans* 251 CGTaz dizisine (289) göre numaralandırılmıştır.

a) β2 iplikçiğindeki CSR-VI bölgesi, amino asit uzunluğu ve bazı özel dizi motifleri bakımından CGTaz'ların α-amilazlardan ayırtedilmesinde önemlidir. α-Amilazların çoğunda bu bölgedeki korunmuş Gly56 ve Pro64 (*A. oryzae* Taka-amilaz A) arasındaki amino asit sayısı 7 iken, bilinen iki arke CGTaz'ı (329, 330) dışında CGTaz'larda bu sayı 8'dir. CSR-VI'da korunmuş prolin amino asitinin (Pro79) *n*-1 pozisyonunda (bir amino asit öncesi) yer alan glutamin kökü (Gln78) (*QP* dizi motifi) ile *n*-4 pozisyonundaki triptofan (Trp75) kökü (α-amilazlarda glutaminin yerinde hiçbir amino asit kökü yer almaz iken, triptofanın yerinde ise glutamin kökü bulunur) (242, 257, 331),

b) β3 iplikçiğindeki CSR-I'de korunmuş asparajin (Asn139) ve histidin (His140) amino asitlerinin önünde yer alan prolin (Pro138) kökü (*PNH* dizi motifi), $Ala_{137}Pro_{138}$ ya da nadiren $Thr_{137}Pro_{138}$ dizisi (diğer amilolitik enzimlerde alanin yerini valin alır) ve değişmeyen, tamamen korunmuş aspartik asit (Asp135) kökünün ardından gelen tipik bir hidrofobik aromatik amino asit olan fenilalanin (Phe136) kökü (*K. pneumoniae*'da tirozin) (257, 276, 331, 332),

c) B domainin C-terminaline yakın loop3 bölgesindeki CSR-V'de asparagin (Asn201) kökü (257),

d) β4 iplikçiğindeki CSR-II'de değişmeyen, tamamen korunmuş arjinin (Arg227) kökünün önünde yer alan izolösin (Ile226) kökü (257, 331),

e) β5 iplikçiğindeki CSR-III'de korunmuş, katalitik glutamik asit (Glu257, proton donörü) kökünü takip eden glisin (Gly256) kökü (*GE* dizi motifi), Glu257 kökünün *n*+1 ve *n*+3 pozisyonlarında yer alan, sırasıyla, tamamen korunmuş triptofan (Trp258) ve lösin (Leu260) kökleri (32, 257, 331),

f) β7 iplikçiğindeki CSR-IV'de korunmuş fenilalanin (Phe323) amino asitinden sonra gelen izolösin (Ile324) ya da lösin kökü ile β7 iplikçiğinin başlangıcında yer alan glutamin (Gln320) ya da metiyonin kökü (257, 331, 332) CGTaz'lar için karakteristiktir.

	β2	β3	loop3	β4	β5	β7
α-Amilazlar						
Bacli	36_GITAVWIP-P	94_DINVYGDVVINH	198_YADID	226_DGFRLDAV	257_FTVAEYWQ	320_AVTFVDNHD
Bacsu	33_GITAIQTS-P	91_GIKVIVDAVINH	144_LYDWN	171_DGFRFDAA	204_FQYGEILQ	261_LVTWVESHD
Strli	32_GYGYVQVS-P	82_GVKVVADSVINH	145_LADLD	172_DGFRIDAA	200_YWKQEAIH	260_SAVFVDNHD
Aspor	56_GFTAIWIT-P	111_GMYLMVDVVANH	173_LPDLD	201_DGLRIDTV	226_YCIGEVLD	289_LGTFVENHD
Barle	34_GVTHVWLP-P	82_GVQAIADIVINH	147_APDID	175_DAWRLDFA	201_LAVAEVWD	283_AATFVDNHD
Drome	36_GYAGVQVS-P	88_GVRTYVDVVFNH	154_LRDLN	181_AGFRVDAA	219_YIVQEVID	280_SLVFVDNHD
Pigpa	36_GFGGVQVS-P	90_GVRIYVDAVINH	165_LLDLA	192_AGFRLDAS	229_FIFQEVID	292_ALVFVDNHD
Yeniden sınıf.	! !	!!!	!	!	! !	! !
Bacci	71_GVTAIWISQP	130_NIKVVIDFAPNH	198_LADLN	225_DGIRVDAV	254_FTFGEWFL	321_QVTFIDNHD
Bacsp	70_GITALWISQP	129_NIKVIIDFAPNH	197_LADLN	224_DGIRMDAV	253_FTFGEWFL	320_QVTFLDNHD
Cloth	70_GVTAIWISQP	128_NIKVIIDFAPNH	196_LADLN	223_DGIRLDAV	252_FTFGEWFL	319_MVTFIDNHD
CGTaz'lar	! !	!!!	!	!	! !	! !
Bacci	70_GVTALWISQP	129_GIKIVIDFAPNH	197_LADFN	224_DGIRVDAV	253_FTFGEWFL	320_QVTFIDNHD
Bacst	67_GVTAIWISQP	125_GIKVIIDFAPNH	193_LADLN	220_DGIRMDAV	249_FTFGEWFL	316_QVTFIDNHD
Bacoh	66_GITAIWISQP	122_GIKVIMDFTPNH	190_LADYD	217_DGIRVDAV	246_FTFGEWFL	313_QVTFIDNHD
Klepn	66_GVTSIWITPP	124_NMKLVLDYAPNH	191_LSDLN	218_DAIRIDAI	253_FFFGEWFG	325_QVVFMDNHD

Şekil 2.17. α-Amilazlar ve siklodekstrin glukanotransferazlardaki korunmuş dizi bölgelerinin karşılaştırılması. CGTaz'lar için karakteristik amino asit kökleri (!) işareti ve mavi renk ile gösterilmiştir. α-Amilazlar: Bacli, *Bacillus licheniformis* (SwissProt aksesyon numarası P06278); Bacsu, *Bacillus subtilis* (P00691); Strli, *Streptomyces limosus* (P09794); Aspor, *Aspergillus oryzae* (TAA, P10529); Barle, arpa (P00693); Drome, *Drosophila melanogaster* (P08144); Pigpa, domuz pankreası (P00690), CGTaz olarak yeniden sınıflandırılanlar: Bacci, *Bacillus circulans* F-2 (P08137); Bacsp, *Bacillus* sp. B1018 (P1 7692); Cloth, *Clostridium thermosulfurogenes* (P26827), CGTaz'lar: Bacci, *Bacillus circulans* 8 (P30920); Bacst, *Bacillus stearothermophilus* (P31797); Bacoh, *Bacillus ohbensis* (P27036); Klepn, *Klebsiella pneumoniae* (P08704) (331, 257)

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Son 80 yıl içinde, prokaryotik taksonomi alanında tanımlanmış tür, alt tür ve daha üst seviyedeki taksonların sayısındaki artışın yanı sıra, sınıflandırma ve isimlendirme kavramlarında da büyük değişikliklere neden olan birtakım gelişmeler olmuştur. Şu an mevcut teknikler ile doğadaki prokaryotik çeşitliliğin sadece bir kısmı kültüre edilebilmektedir. Bu nedenle, prokaryotik çeşitliliği ortaya çıkarmak için daha gelişmiş kültürel ve moleküler araçlar kullanılarak yapılacak olan her türlü taksonomik çalışmanın, literatürde bu konudaki bilgi eksikliğinin doldurulmasına katkıda bulunacağı kesindir (2).

Endüstriyel, biyoteknolojik ve çevresel öneme sahip türler içermeleri ve izole edildikleri habitatlardaki yüksek sıcaklıklara adaptasyon yeteneklerinin enzim yapılarına da yansıyarak, birçok termostabil enzim (termozim) üretme yeteneğine sahip olmaları nedeniyle, yeni termofilik basil türlerinin izole edilerek tanımlanması son yıllarda önemli çalışma konulardan biri haline gelmiştir (68, 252).

Bacillaceae familyasına ait olan *Anoxybacillus* cinsinin tüm üyeleri termofilik olup, ilk defa Pikuta ve ark. (2000) tarafından tanımlanarak literatüre kazandırılmıştır (8). *Anoxybacillus* cinsinin ilk teşhisinin ardından geçen on yıllık süreç içerisinde, temel ve uygulamalı bilimlerden elde edilen bilgiler ışığında, bu cinsin nişasta ve lignoselülozik biyokütlelerin hidrolizi, çevresel atıkların arıtımı, enzim teknolojisi ve biyoenerji üretimi gibi çok sayıda endüstriyel uygulamada kullanılabileceği anlaşılmıştır. Bu nedenle, bu yeni bakteri cinsinin çeşitliliği ve filogenetik ilişkileri üzerine yapılan çalışmalar, cinsin taksonomisinin yanı sıra biyoteknolojik potansiyelinin de ortaya çıkarılması bakımından önem taşımaktadır. *Anoxybacillus* türleri, jeotermal sıcak su kaynaklarında yaygın olarak bulunmakta ve bu alanlardan kolayca izole edilebilmektedir. Asidotolerant veya alkalitolerant, termofilik endospor üreticisi *Anoxybacillus* cinsinin üyeleri, endüstriyel uygulamalardaki yüksek sıcaklık ve pH gibi zorlu işlem koşullarına dayanıklı yeni termostabil enzimlerin kaynağı olmaları bakımından sürekli artan bir biyoteknolojik ve endüstriyel öneme sahiptirler (67).

Sonuç olarak; biyoteknolojik öneme sahip olabilecek termostabil enzim üretebilen, enzim saflaştırılmasına ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalarda materyal olarak kullanılabilecek yeni *Anoxybacillus* türlerinin teşhis edilerek literatüre kazandırılması bakımından tez önerisinin biyoteknoloji alanına katkı sağlama potansiyeli bulunmaktadır.

Ayrıca, bu yeni izolatların tür teşhislerinin yapılması, bir yandan ülkemizin zengin mikroflorasındaki çeşitliliğin ortaya çıkarılması, diğer yandan da uluslararası bakteri veri tabanına mikrobiyal taksonomi seviyesinde önemli bilgiler kazandırabilecek olması bakımından önemlidir.

Bu tez çalışmasında,

- Bazı moleküler ve filogenetik ön çalışmalardan elde edilen verilere dayanılarak yeni *Anoxybacillus* türleri olabileceği öngörülen, E184aa ve E208a kodlu, α-amilaz enzim üreticisi termofilik *Anoxybacillus* izolatlarının fenotipik, kemotaksonomik ve moleküler taksonomik yaklaşımlar kullanılarak tür seviyesinde tanımlanmaları,

- Literatürde *Anoxybacillus* cinsine ait türlerde yaygın olduğu bilinen amilolitik aktivite, az sayıda suşla yapılmış sınırlı sayıdaki çalışma (18) haricinde, ilk kez bu tez kapsamında çok sayıda *Anoxybacillus* cinsi izolatın ve tip suşun gen seviyesinde araştırılması,

- Olası biyoteknolojik öneme sahip enzim kaynağı mikroorganizmaların belirlenmesi,

- Dizilenen *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşlarının α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz genlerinin annotasyon çalışmaları ve gerçekleştirilen filogenetik analizleri sonucunda α-amilaz ve CGTaz genlerindeki varyasyonların ortaya çıkarılması ve *in siliko* teknikler kullanılarak ilgili enzimlerin olası amino asit dizilerinde yer alan korunmuş dizi bölgelerinin ve bu bölgelerde yer alan enzim aktivitesi ve substrat bağlanması için önemli amino asitlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. BAKTERİ İZOLATLARI VE REFERANS TÜRLER

4.1.1.1. Referans Termofilik *Anoxybacillus* Türleri

Bu çalışma kapsamında, özellikle izolatların fenotipik ve genotipik karakterlerine göre yakınlık gösterdikleri referans türlerin belirlenebilmesi ve biyokimyasal test sonuçlarının doğru yorumlanabilmesi amacıyla, **E184aa** ve **E208a** kodlu *Anoxybacillus* izolatları ile birlikte 18'i *Anoxybacillus*, 2'si *Geobacillus* ve 1'i *Bacillus* cinsine ait olmak üzere toplam 21 adet referans tür tüm testlerde çalışmaya dahil edilmiştir. Ancak, yaptığımız araştırmada *A. flavithermus* subsp. *flavithermus* DSM 2641^T alt türünün, bağlı olduğu *A. flavithermus* tip suşu ile gerek Genbank aksesyon numarası gerekse kültür koleksiyon numarası yönünden incelendiğinde, aynı bakteriler oldukları tespit edildiğinden, tez kapsamında temin edilen *A. flavithermus* subsp. *flavithermus* çalışmalara dahil edilmemiştir. Kültür koleksiyonumuzda bulunmayan *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T, *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T, *A. mongoliensis* DSM 19169^T, *A. suryakundensis* DSM 27374^T ve *A. flavithermus* subsp. *flavithermus* DSM 2641^T olmak üzere 5 adet referans tür ise DSMZ Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Ayrıca, *A. kaynarcensis* DSM 21706^T referans türü Karadeniz Teknik Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Diğer referans türler Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer almaktadır.

4.1.1.2. *Anoxybacillus* Cinsi Bakteri İzolatları

Cihan ve ark. (2009, 2012 ve 2013) tarafından yapılan çalışmalar ile Aydın, İzmir, Nevşehir ve Ankara illerinde yer alan farklı jeotermal alanlardan izole edilmiş 53 *Anoxybacillus* cinsi bakteri izolatının bazı fenotipik testlerinin yanı sıra 16S rRNA genlerine ait dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, bu izolatların *Anoxybacillus* cinsine ait Gram (+), hareketli, spor oluşturabilen ve amilolitik aktivite gösteren termofilik basiller oldukları belirlenmiştir (66, 147, 333). Bu izolatlar içerisinden, yeni bakteri türleri olabileceği öngörülen 6 *Anoxybacillus* izolatı seçilmiş ve bu tez kapsamında tür seviyesinde teşhisleri yapılacak *Anoxybacillus* cinsi bakteri izolatlarının saptanabilmesi için bazı ilave moleküler ve filogenetik ön çalışmalar yapılmıştır. 6

Anoxybacillus izolatının 16S rRNA gen dizi analizlerinin tekrarlanması sonucunda, bu izolatların birbirlerine % 97.0-99.2 ve tanımlanmış tüm referans *Anoxybacillus* suşlarına ise % 93.7-99.6 oranları arasında 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdikleri tespit edilmiştir. E184aa ve E208a kodlu izolatların ise diğer tanımlanmış türlere düşük 16S rRNA gen dizi benzerliği göstermeleri, bu iki izolatın yeni türler olabileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle, 6 *Anoxybacillus* izolatı arasından tam tür teşhisi için sadece **E184aa** ve **E208a** kodlu izolatlar bu çalışma kapsamına dahil edilmiştir. Tez çalışmasında materyal olarak kullanılan bu iki izolat, Nevşehir ili, Kozaklı ilçesi, Bağlıca vadisindeki Kozaklı Belediye kaplıcasından alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir. Bu izolatlar gliserol içeren ortama alınmış olup, laboratuvarımızda -80°C'de muhafaza edilmektedir. Ayrıca, ön çalışmalarda kullanılan D222b, E184ab, A3210 ve A321 kodlu yüksek amilaz üreticisi izolatlar, enzim üretim kapasiteleri düşünülerek sadece kalitatif ve kantitatif α-amilaz aktivite tayini ve amilaz gen dizilemesi çalışmalarına alınmıştır. Tez kapsamında kullanılan toplam 27 *Anoxybacillus* izolatı ve referans türün listesi Çizelge 4.1'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.1. Tez kapsamında kullanılan *Anoxybacillus* izolatları ve referans türler

***Anoxybacillus* izolatları**						
Sıra No	**İzolat Kodu**	**İzole Edildiği Yer/Bölge**	**Kaynağı***	**Örnek türü**	**16S rRNA GenBank Aksesyon Numarası**	**Referans**
1	E184aa	Bağlıca vadisi içi, Kozaklı, Nevşehir	Kozaklı Belediye Kaplıcası	Toprak	FJ430059.3	(66, 147, 333)
2	E208a	Bağlıca vadisi içi, Kozaklı, Nevşehir	Kozaklı Belediye Kaplıcası	Toprak	FJ430063.3	
3	A3210	Ömerbeyli, Germencik, Aydın	Aktaş MTA sondaj kuyusu	Toprak	FJ429569.3	
4	A321	Ömerbeyli, Germencik, Aydın	Aktaş MTA sondaj kuyusu	Toprak	FJ429993.3	
5	D222b	Dikili, Kaynarca, Kocaoba Mevkii, İzmir	Sıcak su artezyen kuyusu	Su	FJ429576.2	
6	E184ab	Bağlıca vadisi içi, Kozaklı, Nevşehir	Kozaklı Belediye Kaplıcası	Toprak	FJ429585.2	

Referans Türler				
Sıra No	**Kültür koleksiyon numarası**	**Tür Adı**	**16S rRNA GenBank Aksesyon Numarası**	**Referans**
1	DSM 22626^T	*Anoxybacillus salavatliensis*	EU326496	(82)
2	DSM 25220^T	*Anoxybacillus calidus*	FJ430012	(71)
3	NCIMB 13933^T	*Anoxybacillus gonensis*	AY122325	(72)
4	NCIMB 13972^T	*Anoxybacillus ayderensis*	AF001963	(73)
5	NCIMB 13971^T	*Anoxybacillus kestanbolensis*	AY248711	(73)
6	DSM 2641^T	*Anoxybacillus flavithermus*	CP000922	(8)
7	DSM 14988^T	*Anoxybacillus kamchatkensis*	AF510985	(152)

Çizelge 4.1. (devam)

Referans Türler				
Sıra No	**Kültür koleksiyon numarası**	**Tür Adı**	**16S rRNA GenBank Aksesyon Numarası**	**Referans**
8	DSM 15939T	*Anoxybacillus amylolyticus*	AJ618979	(16)
9	DSM 15730T	*Anoxybacillus caldiproteolyticus*	FN428698	(52, 154)
10	DSM 16325^{T}	*Anoxybacillus tepidamans*	FN428691	(52, 155)
11	DSM 17141^{T}	*Anoxybacillus thermarum*	AM402982	(77)
12	DSM 17127^{T}	*Anoxybacillus rupiensis*	AJ879076	(75)
13	DSM 17075^{T}	*Anoxybacillus voinovskiensis*	AB110008	(74)
14	DSM 18475^{T}	*Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*	AM999779	(153)
15	KCTC 13759^{T}	*Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis*	HM016869	(78)
16	DSM 19169^{T}	*Anoxybacillus mongoliensis*	EF654664	(117)
17	DSM 27374^{T}	*Anoxybacillus suryakundensis*	KC958552	(70)
18	DSM 21706^{T}	*Anoxybacillus kaynarcensis*	EU926955	(81)
19	DSM 22^{T}	*Geobacillus stearothermophilus*	FN428694	(46, 52, 334)
20	DSM 2542^{T}	*Geobacillus thermoglucosidans*	FN428685	(335)
21	DSM 7^{T}	*Bacillus amyloliquefaciens*	AB006920	(336-339)

* İzolatların temin edildiği jeotermal alanların su sıcaklığı 50-100°C ve pH değerleri ise 6.0-9.0 arasında değişmektedir.

4.1.2. BESİYERLERİ

-80°C'de gliserol stoklarında saklanan *Anoxybacillus* izolatları ve referans türlerin aktifleştirilmesi, amilolitik aktivitelerinin belirlenmesi ve bazı fenotipik karakterizasyon testlerinin (koloni morfolojileri, spor oluşum özellikleri, Gram-boyama, antibiyogram, amilaz ve bazı biyokimyasal testler) gerçekleştirilmesi amacıyla *Geobacillus thermoglucosidasius* besiyeri olarak bilinen Medium I (MI) katı besiyeri (340, 341) kullanılmıştır. Bakterilerin koloni morfolojilerinin belirlenmesi için MI katı besiyerinin yanı sıra, Tryptic Soy Broth (TSB) sıvı besiyeri de kullanılmıştır. İzolatların ve referans suşların farklı sıcaklık, pH ve tuz oranlarındaki optimum üremelerinin belirlenmesi için Nutrient Broth (NB) (Merck, 1.05443), katalaz aktivitelerinin belirlenmesi için Nutrient Agar (NA) (Merck, 1.05450) ve kazein hidroliz testi için ise % 5 oranında skim milk powder içeren kazein besiyeri kullanılmıştır. Hücre morfolojileri, hücre boyutları ve hareket yeteneklerinin incelenmesi için MI katı besiyerinde üretilmiş kültürlerden alınan örneklerin % 0.85'lik serum fizyolojik (SF) ile süspanse edilerek hazırlanmış preparatları kullanılmıştır. α-Amilaz üreticisi *Anoxybacillus* izolatlarını enzim üretimi için geliştirmek amacıyla modifiye Santos ve Martins (2003) sıvı besiyeri (342) kullanılmıştır. Besiyeri içerikleri aşağıda sunulmuştur.

Medium I Agar besiyeri içeriği (340, 341)

İçerik	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Çözünür nişasta	10 g	Sigma, S2004
Kazein Pepton	5 g	Merck, 1.07213
Yeast ekstrakt	3 g	Merck, 1.03753
Meat ekstrakt	3 g	Merck, 1.03979
Potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4)	3 g	Sigma, P8281
Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4)	1 g	Sigma, P5379
Agar	30 g	Scharlau, AG0020
Distile su	1000 mL	
pH*: 7.0		

* Sterilizasyon öncesi besiyeri pH'sı 2 N NaOH ile 7.0 olarak ayarlanmıştır.

Modifiye Santos ve Martins sıvı besiyeri içeriği (342)

İçerik	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Kazein Pepton (Tripton)	10 g	Merck, 1.07213
Yeast ekstrakt	5 g	Merck, 1.03753
Çözünür nişasta	10 g	Sigma, S2004
Distile su	1000 mL	
pH*: 7.5		

* Sterilizasyon öncesi besiyeri pH'sı 2 N NaOH ile 7.5 olarak ayarlanmıştır.

Tryptic Soy Agar besiyeri içeriği

İçerik	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Kazein Pepton	17 g	Merck, 1.07213
Soya pepton	3 g	Fluka, 70178
D-Glukoz	2.5 g	Merck, 1.08342
Potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4)	2.5 g	Sigma, P8281
Sodyum klorür (NaCl)	5 g	Merck, 1.06404
Agar	30 g	Scharlau, AG0020
Distile su	1000 mL	
pH*: 7.3		

* Sterilizasyon öncesi besiyeri pH'sı 2 N NaOH ile 7.3 olarak ayarlanmıştır.

Kazein besiyeri içeriği

İçerik	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Skim milk powder	100 g	Fluka, 70166
Agar	20 g	Scharlau, AG0020
Distile su	1000 mL	
pH*: 6.7		

* Sterilizasyon öncesi besiyeri pH'sı 1 N HCl ile 6.7 olarak ayarlanmıştır.

4.1.3. TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER

4.1.3.1. Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Tris-EDTA (TE) Tamponu: 9.28 g EDTA (Sigma, E5134) 40 mL distile su içerisinde çözülmüş ve 2 N NaOH (Merck, 1.06482) çözeltisi ile pH'sı 8.0'e ayarlanmıştır. 0.6 g Trisma-Base (Sigma, T6066) 20 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra, hazırlanan

EDTA karışımı ilave edilerek, son hacim steril distile su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve pH 7.0'ye ayarlanarak otoklavda steril edilmiştir.

Lizozim çözeltisi: 0.01 g/mL'lik lizozim stok çözeltisi hazırlamak için; 0.1 g lizozim (Sigma, L7651) üzerine 0.3 g Trisma-Base (Sigma, T6066) ilave edilerek son hacim steril distile su ile 10 mL'ye tamamlanmış ve pH 8.0'e ayarlanarak filtre ile steril edilip her defasında taze hazırlanmıştır.

RNaz çözeltisi: 1 mg/mL RNaz stok çözeltisi hazırlamak için; 5 mL steril distile su içinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat (Sigma, 25022) çözeltisinin pH'sı, asetik asit (Sigma, 27225) ile 5.0'e ayarlanmış ve üzerine 5 mg RNaz A (Fermentas, EN0531) ilave edilmiştir. Hazırlanan RNaz çözeltisi, steril 1.5 mL'lik eperdorf tüplerine bölüştürülerek -20ºC'de muhafaza edilmiştir.

4.1.3.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Agaroz Jeller

10X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Tamponu: 108 gr Trisma-Base (Sigma, T6066), 55 gr Borik asit (Sigma, B6768) ve 40 mL 0.5M EDTA (Sigma, E5134), (pH 8.0) 800 mL steril distile su içerisinde çözündükten sonra, son hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır. 100 mL 10X TBE tamponu, 900 mL steril distile su ile 1X konsantrasyonuna seyreltilerek agaroz jel elektroforezinde kullanılmıştır.

% 1 ve % 1.5'luk Agaroz Jel: PCR ürünlerinin mini yatay agaroz jel elektroforez tankında (TermoFisher Scientific, OWL-B2-CST, 12x14 cm) yürütülmesi için; 1 gr agaroz (Sigma, A9539) üzerine son hacim 100 mL olacak şekilde 1X TBE tamponu ilave edilerek % 1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Maksi boy yatay agaroz jel elektroforez tankı (TermoFisher Scientific, 15x25 cm) için 3.75 g agaroz (Sigma, A9539) üzerine son hacim 250 mL olacak şekilde 1X TBE tamponu ilave edilerek % 1.5'luk agaroz jel hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımların mikrodalga fırında çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra, stok etidyum bromür (EtBr) solüsyonundan (Sigma, E8751) 5 µL eklenerek iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti jel tablasına dökülmüş ve 25-30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek iyice katılaşması sağlanmıştır.

4.1.3.3. α-Amilaz Aktivitesinin Kantitatif Tayininde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

0.2 M Sodyum-Fosfat Tamponu: 2.4 g sodyum fosfat monobazik (Na_2HPO4), (Sigma, 71496) üzerine 0.38 g sodyum klorür (NaCl), (Merck, 1.06404) ilave edilerek steril distile su ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmış ve pH 7.0'ye ayarlanarak otoklavda steril edilmiştir.

3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) ayıracı: Bu ayıraç, α-amilaz aktivitesini durdurmak amacıyla kullanılmıştır. 1 gr DNS (Sigma, D0550) 50 mL steril distile su içerisinde çözüldükten sonra 30 gr potasyum sodyum tartarat ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$), (Merck, 1.08087) ve 20 mL 2N NaOH (Merck, 1.06482) çözeltisi ilave edilerek, son hacim steril distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım otoklavda steril edildikten sonra ışık görmemesi için alüminyum folyo ile sarılmıştır.

4.1.3.4. Gitschier Tamponu (5X)

5X Gitschier Tamponu, $(GTG)_5$ ve BOX-PCR reaksiyonlarında kullanılmıştır. 1 M $(NH_4)_2SO_4$ (Sigma, 31119)'dan 830 µL, 1 M Tris-HCl (pH 8.8)'den 3350 µL, 1 M $MgCl_2$ (Fermentas, R0971)'den 335 µL, 5 mM EDTA (pH 8.8) (Sigma, E5134)'dan 65 µL ve β-merkaptoetanol (AppliChem, A1108)'den 104 µL alınarak 5316 µL steril distile su içerisinde çözülmüş ve toplam 10 mL hacminde Gitschier tamponu hazırlanmıştır.

4.1.4. KİMYASALLAR

Tez kapsamında kullanılan tüm kimyasalların listesi Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Tez kapsamında kullanılan tüm kimyasalların listesi

Kimyasalın Adı	Marka ve katalog numarası
Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerde kullanılan kimyasallar	
Nişasta (patates nişastasından)	Sigma, S2004
Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4)	Sigma, P5379
Potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4)	Sigma, P8281
Agar	Scharlau, AG0020
Kazein Pepton (tripton)	Merck, 1.07213
Yeast ekstrakt	Merck, 1.03753
Meat ekstrakt	Merck, 1.03979
Soya pepton	Fluka, 70178
D-Glukoz	Merck, 1.08342
Skim milk powder	Fluka, 70166
Antibiyogramda kullanılan antibiyotik diskleri	
Kanamisin (K), 30 µg	Oxoid, CT 0026 B (5 x 50 disk)
Novobiosin (Nv), 30 µg	Oxoid, CT 0038 B (5 x 50 disk)
Vankomisin (Va), 30 µg	Oxoid, CT 0058 B (5 x 50 disk)

Çizelge 4.2. (devam)

Kimyasalın Adı	Marka ve katalog numarası
Antibiyogramda kullanılan antibiyotik diskleri	
Penisilin G (P), 10 U	Oxoid, CT 0043 B (5 x 50 disk)
Neomisin (N), 30 µg	Oxoid, CT 0033 B (5 x 50 disk)
Azitromisin (AZM), 15 µg	Oxoid, CT 0906 B (5 x 50 disk)
Tetrasiklin (Te), 30 µg	Oxoid, CT 0054 B (5 x 50 disk)
Kloramfenikol (C), 30 µg	Oxoid, CT 0013 B (5 x 50 disk)
Bazitrasin (B), 10 U	Oxoid, CT 0005 B (5 x 50 disk)
Rifampisin (Rf), 30 µg	Oxoid, CT 0207 B (5 x 50 disk)
Genomik DNA izolasyonu, agaroz jel elektroforezi ve PCR reaksiyonlarında kullanılan kimyasallar	
Lizozim	Sigma, L7651
RNaz A, 10mg	Fermentas, EN0531
Sodyum asetat	Sigma, 25022
Asetik asit	Sigma, 27225
Amonyum sülfat [$(NH4)_2SO_4$]	Sigma, 31119
Kloroform	Merck, 1.02431
Saf etanol	Scharlau, ET0013
Trisma-Base	Sigma, T6066
EDTA	Sigma, E5134
Borik Asit	Sigma, B6768
Agaroz	Sigma, A9539
Etidyum bromür (EtBr)	Sigma, E8751
6X DNA yükleme boyası	Fermentas, R0611
GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder, 50 µg	Fermentas, SM1334
dNTP mix (10mM)	Fermentas, R0192
Taq DNA polimeraz, 500 U	Fermentas, EP0402
Magnezyum klorür ($MgCl_2$) (25 mM)	Fermentas, R0971
10X Taq tamponu + KCl	Fermentas, B38
DMSO (dimetil sülfoksit)	Appli Chem, A3006
BSA (sığır serum albümin)	Sigma, B4287
β-merkaptoetanol	AppliChem, A1108
FastDigest® AluI	Fermentas, FE-FD0014
FastDigest® HaeIII (BsuRI)	Fermentas, FE-FD0154
FastDigest® TaqI	Fermentas, FE-FD0674
α-Amilaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan kimyasallar	
Sodyum fosfat monobazik (Na_2HPO_4)	Sigma, 71496
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.06404
3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS)	Sigma, D0550
Potasyum, sodyum tartarat ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$)	Merck, 1.08087
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 1.06482

4.1.5. KİTLER

Tez kapsamında kullanılan kitler; Genomik DNA İzolasyon kiti (100 reaksiyonluk); (Fermentas, K0512), PCR ürünlerinin saflaştırılması için GeneJET^{TM} PCR Purification kit (250 reaksiyonluk); (Fermentas, K0702), biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere reaktifleri ile birlikte temin edilen 10 strip API 50CH (bioMérieux, Fransa, 50300) ve 25 strip API 20E (bioMérieux, Fransa, 20100) kitleri ve bakterilerin flagella varlığının ve tipinin belirlenmesi için kullanılan Flagella Stain Droppers kitidir (TermoFisher Scientific, BD 261206).

4.1.6. MOLEKÜLER VE FİLOGENETİK ANALİZLERDE KULLANILAN BİYOİNFORMATİK ARAÇLAR

α-Amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz gen dizilerinin biyoinformatik araçlarla işlenmesinde ve filogenetik analizlerinde kullanılan tüm yardımcı programlar, kullanım amaçları ve internet erişim adresleri Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz gen dizilerinin biyoinformatik araçlarla işlenmesinde ve filogenetik analizlerinde kullanılan yazılım programları

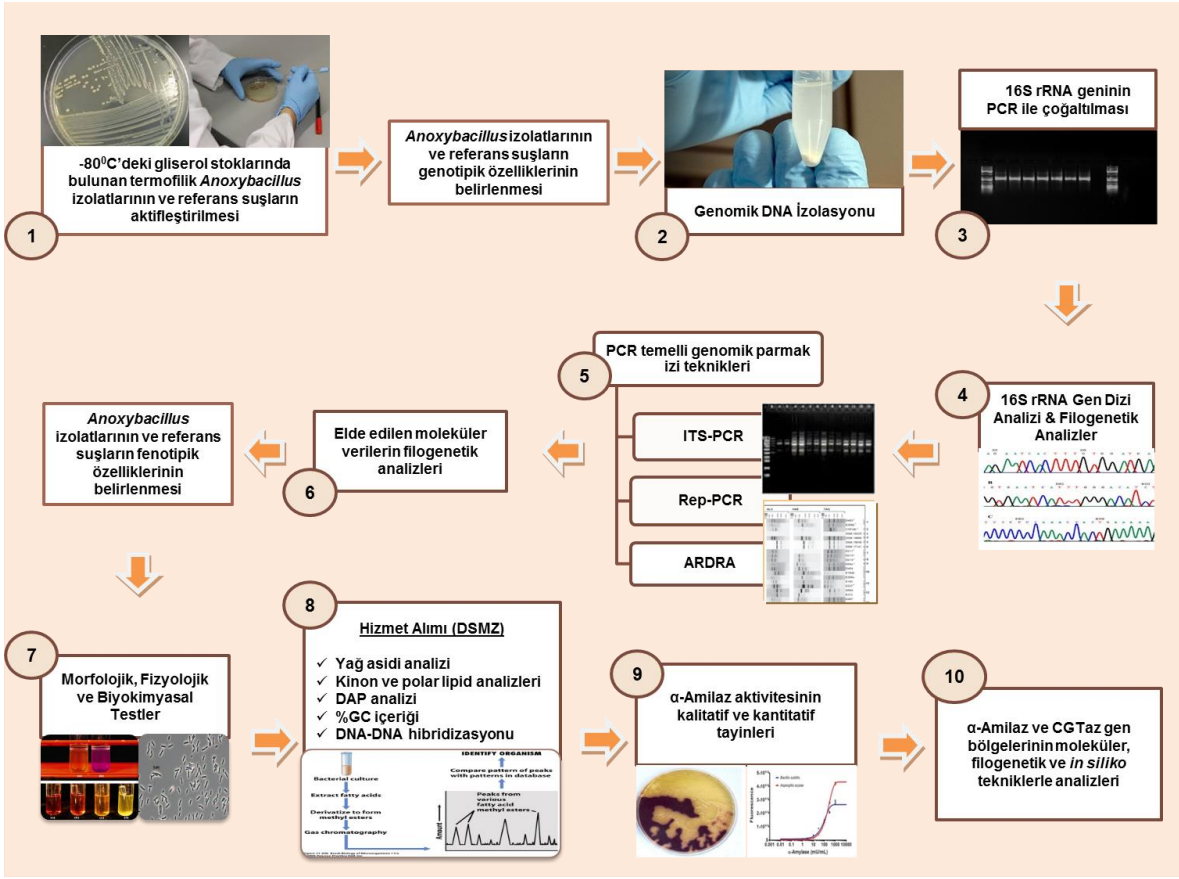
Yazılımın adı	Kullanım amacı	İnternet erişim adresi/Referanslar
Primer3web version 4.0	Primer tasarımı	http://primer3.ut.ee; (343, 344)
Geneious R10	Gen dizilerinin birleştirilmesi ve hizalanması, amino asit ve genom içeriğinin analizi, gen dizilerinin referans dizilere benzerlik oranlarının belirlenmesi, genlerin filogenetik analizleri	http://www.geneious.com; (345)
NCBI-BLASTN	GenBank veri tabanında mevcut benzer enzimleri kodlayan diğer gen dizileriyle karşılaştırma, gen dizilerinin referans dizilere benzerlik oranlarının belirlenmesi	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov; (346)
NCBI-BLASTP	GenBank veri tabanında mevcut benzer enzimleri kodlayan diğer amino asit dizileriyle karşılaştırma, amino asit dizilerinin referans dizilere benzerlik oranlarının belirlenmesi	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov; (346)
NCBI-conserved domain search	Olası amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz amino asit dizilerinde; α-amilaz süperfamilyasına ait korunmuş dizilerin mevcudiyeti, en çok hangi α-amilaz familyasına ait enzim(ler)e benzerlik gösterdikleri ve mevcut aktif/katalitik bölgelerinin belirlenmesi (annotasyon)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi; (347)
MEGA version 6	Primer dizaynı, gen dizilerinden olası amino asit dizilerinin belirlenmesi, dizilerin hizalanması, genlerdeki bazların mevcut dizilerle karşılaştırılması, DNA dizilerinin amino asit diline translasyonu, filogenetik ve evrimsel analizler	http://www.megasoftware.net/; (348)
Clustal OMEGA	Elde edilen olası protein dizilerinin, GenBank'ta benzerlik gösterdikleri referans amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz protein dizileri ile hizalanması ve tüm protein dizilerinde belirlenmiş olan korunmuş dizi bölgeleri ile aktif/katalitik bölgelerdeki amino asit köklerinin işaretlenmesi	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/; (349)
NCBI-Banklt	Dizilenen ve CDS (Conserved Domain Search) annotasyonu yapılan gen dizilerinin GenBank aksesyon numaralarının alınması	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank; (350)
WebLogo 3.5.0	Amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz protein dizilerinde belirlenen korunmuş bölgelerin logolarının hazırlanması	http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi; (351)

4.1.7. KULLANILAN MAKİNE-TEÇHİZAT

Tez kapsamında kullanılan makine-teçhizat listesi Ek-1'de verilmiştir.

4.2. YÖNTEM

Bu çalışmada uygulanan yöntemler Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Tez kapsamında uygulanan yöntemlerin akış şeması

4.2.1. GENOTİPİK ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ

Anoxybacillus izolatlarının ve referans suşların moleküler analizleri en az 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. -80°C'de gliserol stoklarında saklanan bakteri izolatlarının aktifleştirilmesi için, izolatların gliserol stoklarından Medium I (MI) katı besiyerine ekim yapılmış ve 55-65°C'de 18-72 saat inkübe edilerek izolatların aktifleşmeleri sağlanmıştır (340, 341). Moleküler tekniklerin uygulanabilmesi amacıyla öncelikli olarak örneklerin genomik DNA'ları izole edilmiştir.

4.2.1.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu, MI besiyerinde 55-65°C'de 18 saat üretilen kültürlerden DNA izolasyon kiti (Fermentas, K0512) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kitin prosedürüne göre; üreyen kültürlerden toplanan peletler, 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak susuz

ağırlıkları 10-40 mg arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra, hücreler 200 µL'lik Tris-EDTA tamponu (pH 7.0) ile iyice çözülmüş ve 10 mg/mL'lik lizozim çözeltisinden 50.9 µL eklenerek karıştırılmış ve 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Kit içerisinde bulunan 40 mL'lik Lizis tamponundan 400 µL eklendikten sonra 70°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, 600 µL kloroform eklenmiş tüpler 3-5 kez alt üst edilip karıştırılmış ve sonra 13.000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz alınıp bu aşama bir kez daha tekrar edilmiştir. Her bir örnek için; 720 µL steril deiyonize su, kit içerisinde bulunan 80 µL'lik 10X presipitasyon solüsyonu ile karıştırılarak presipitasyon solüsyonu taze olarak hazırlanmıştır. Üst faz 1.5 mL'lik yeni bir santrifüj tüpüne alınmış ve her bir tüpe 800 µL presipitasyon solüsyonundan eklenmiştir. Tüpler 3-5 kez alt üst edilip karıştırılmış ve 13.000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek DNA'ların çöktürülmesi sağlanmıştır. Üst faz tamamen atılmış ve DNA peletleri, kit içerisinde yer alan 100 µL'lik 1.2 M NaCl solüsyonunda hafifçe vortekslenerek iyice çözülmüştür. 5 mg/mL'lik RNaz A solüsyonundan 4-5 µL eklenip 37°C'de 30 dakika inkübe edilerek RNA'lar uzaklaştırılmıştır. % 100'lük soğuk etanolden 300 µL eklendikten sonra tüpler -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. Ertesi gün örnekler -20°C'den çıkarılarak oda sıcaklığında çözülmüş ve 13.000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra 300 µL % 70'lik soğuk etanol eklenmiş ve 13.000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısım uzaklaştırılarak, genomik DNA içeren pelletler oda sıcaklığında kurutulmuş ve alkol uzaklaştırılmıştır. Peletler kurutulduktan sonra 50 µL steril deiyonize su içerisinde dikkatlice çözülmüştür.

İzole edilen genomik DNA moleküllerinin saflığı ve bütünlüğü, % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile belirlendikten sonra, NanoDrop Spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific Nanodrop, ND-1000) kullanılarak DNA miktarları (ng/µL) belirlenmiş ve saflık kontrolü 260, 280 ve 230 nm'deki absorbansları dikkate alınarak 260/280 ve 260/230 oranları ile belirlenmiştir. İzole edilen DNA'lar, moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.1.2. 16S rRNA Geninin PCR ile Çoğaltılması

E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının ve 21 referans suşun ARDRA analizlerinde de kullanılan ve yaklaşık 1.500 bç'lik 16S rRNA gen dizilerinin çoğaltıldığı polimeraz zincir reaksiyonu, bakterilerin 16S rRNA gen bölgesine spesifik olan 27F ileri ve 1492R geri primerleri (352) kullanılarak gerçekleştirilmiştir 16S rRNA PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlere ait dizi bilgileri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. 16S rRNA PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizi bilgileri

Hedef Gen Bölgesi	Primer Dizileri (5'-3')	Lokasyon	T_m (°C)	Amplikon (bç)	Referans
16S rRNA	27F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27	52	~ 1.500	(352)
	1492R:TACGGTTACCTTGTTACGACTT	1513-1492	52		

PCR reaksiyonları, Çizelge 4.5'de miktarları belirtilen PCR reaktifleri ve Çizelge 4.6'da verilen reaksiyon koşulları kullanılarak 200 µL'lik tüplerde, Thermal Cyler cihazında (Applied Biosystems Veriti) gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.5. 16S rRNA geninin çoğaltılması için uygulanan PCR protokolü

Reaksiyon bileşenleri	Miktar (µL)	Stok Konsantrasyonu
Taq Tamponu + KCl*	5 µL	10X
$MgCl_2$	4 µL	25 mM
dNTP	1 µL	10 mM
İleri primer	1 µL	20 pmol/µL
Geri primer	1 µL	20 pmol/µL
Taq DNA Polimeraz	0.3 µL	5 U/µL
Kalıp DNA	1.5 µL	200 ng/µL
ddH_2O	36.2 µL	-
Toplam Hacim	**50 µL**	

*100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.8

Çizelge 4.6. 16S rRNA geninin çoğaltılması için uygulanan PCR reaksiyon koşulları

Reaksiyon aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94°C	2 dk	1
Denatürasyon	94°C	45 sn	30 döngü
Primer bağlanması	55°C	45 sn	
Zincir uzaması	72°C	1.5 dk	
Son zincir uzaması	72°C	7 dk	1
	4°C	∞	1

PCR ürünleri, 75-20.000 bç'lik DNA Ladder kullanılarak etidyum bromür içeren % 1.5'luk agaroz jel elektroforezinde 120 V'da 1.5-2 saat yürütülmüş ve jel görüntüleme ve analiz sisteminde (Vilber Lourmat) görüntülenmiştir. 16S rRNA PCR ürünlerinin moleküler ağırlıkları, Quantum-Capp software görüntüleme sistemi yardımıyla kilobaz (kb) cinsinden hesaplanmıştır. *Anoxybacillus* izolatlarına ait 16S rRNA PCR ürünleri, ortamdaki primerler ve dNTP gibi reaksiyon artıklarının uzaklaştırılması amacıyla PCR ekstraksiyon kiti (Fermentas, K0702) yardımıyla saflaştırılmış ve saflaştırılan PCR ürünlerinin çift yönlü dizi analizi ise hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında

tekrarlanan DNA dizi analizlerinden elde edilmiş 16S rRNA gen dizi verileri, mevcut GenBank aksesyon numaraları altında güncellenmiştir.

4.2.1.3. 16S rRNA Gen Dizilerinin Filogenetik Analizleri

DNA dizi analizi sonucunda elde edilen 16S rRNA gen dizileri, BLASTN dizi eşleştirme programı (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, 346) yardımıyla GenBank (97) ve EzBioCloud (http://www.ezbiocloud.net/, 353) veri tabanlarında mevcut olan referans suşlara ait dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki % benzerlik oranları belirlenmiştir. İzolat ve referans suşlara ait 16S rRNA gen dizi verileri, Geneious R10 (http://www.geneious.com, 345) programı yardımıyla düzenlenip ClustalW uygulamasıyla hizalanmıştır (354). Diziler arasındaki evrimsel uzaklık matriksi, Kimura 2-parametre metodu temel alınarak hesaplanmıştır (355). Filogenetik ağaç, Neighbour-joining metodu (356) kullanılarak oluşturulmuş ve 1000 bootstrap numunelemesi (357) ile Mega 6 programında (http://www.megasoftware.net/, 348) değerlendirilmiştir.

4.2.1.4. PCR Temelli Genomik Parmak İzi Teknikleri ve Filogenetik Analizler

4.2.1.4.1. Çoğaltılmış Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA)

ARDRA analizinde, 16S rRNA geninin 27F ve 1492R primerleriyle çoğaltılması sonucu elden edilen PCR ürünü, restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılmıştır. E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşların çoğaltılmış 16S rRNA geni PCR ürünleri (1.5 µg 16S rDNA); 30 µL son reaksiyon hacminde ***Alu*I**, ***Hae*III** ve ***Taq*I** restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Bu restriksiyon endonükleazlarının çift iplikli DNA'daki kesim bölgeleri Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. *Alu*I, *Hae*III ve *Taq*I restriksiyon endonükleaz enzimlerinin çift iplikli DNA'daki kesim bölgeleri

***Alu*I enziminin kesim bölgesi**	***Hae*III enziminin kesim bölgesi**	***Taq*I enziminin kesim bölgesi**
5'... **A G↓C T**...3' 3'... **T C↑G A**...5'	5'... **G G↓C C**... 3' 3'... **C C↑G G**...5'	5'... **T↓C G A**... 3' 3'... **A G C↑T**... 5'

16S rRNA PCR ürünlerinin kesim reaksiyonları, Çizelge 4.8'de miktarları verilen Fermentas FastDigest restriksiyon enzimleri ve Çizelge 4.9'da belirtilen reaksiyon koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.8. 16S rRNA PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonları (ARDRA) için uygulanan protokol

Reaksiyon bileşenleri	Miktar (µL)
PCR ürünü	10 µL
10 X Fast Digest Green Tamponu	2 µL
Fast Digest restriksiyon enzimi	1 µL
ddH_2O	17 µL
Toplam Hacim	**30 µL**

Çizelge 4.9. Restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen kesim reaksiyon koşulları

Restriksiyon enzimi	Sıcaklık (°C)	Süre
*Alu*I	37°C	15 dk (inkübasyon)
	65°C	5 dk (inaktivasyon)
*Hae*III	37°C	7 dk (inkübasyon)
*Taq*I	65°C	5 dk (inkübasyon)

***Alu*I** restriksiyon enzim kesim reaksiyonunda, ***Hae*III** ve ***Taq*I** restriksiyon enzimlerinden farklı olarak, 30 µL'lik reaksiyon karışımı 37°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra 65°C'de 5 dakika termal inaktivasyon ile reaksiyon işlemi durdurulmuştur. ***Hae*III** ve ***Taq*I** restriksiyon enzimleri ile termal inaktivasyon uygun olmadığından, Çizelge 4.9'da belirtilen sıcaklıklardaki inkübasyon sonrası enzim kesim ürünleri -20°C'de bir süre tutulup enzim reaksiyonu durdurulmuş ve sonrasında jele yüklenmiştir. Restriksiyon enzim kesim ürünleri % 1.5'luk agaroz jelde, 1X TBE tamponu kullanılarak 120 V'da 3 saat yürütülüp jel görüntüleme ve analiz sisteminde görüntülenmiştir (215).

4.2.1.4.2. İntergenik 16S-23S rRNA Gen Dizilerinin PCR Reaksiyonu (ITS-PCR)

E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans suşların 16S ve 23S rRNA genleri arasındaki ITS bölgesinin çoğaltılması amacıyla S-D-Bact-1494-a-S-20 ve L-D-Bact-0035-a-A-15 primerleri (179) kullanılmıştır. ITS-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlere ait dizi bilgileri Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. ITS-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizi bilgileri

Hedef Gen Bölgesi	Primer Dizileri (5'-3')	T_m (°C)	Referans
16S ve 23S rRNA genleri arasındaki ITS gen bölgesi	S-D-Bact-1494-a-S-20 ileri primer: GTCGTAACAAGGTAGCCGTA	58.4	(179)
	L-D-Bact-0035-a-A-15 geri primer: CAAGGCATCCACCGT	48.9	

ITS-PCR reaksiyonları, Daffonchio ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada önerildiği şekliyle uygulanarak, Çizelge 4.11'de miktarları belirtilen PCR reaktifleri ve Çizelge

4.12'de verilen reaksiyon koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (179). Elde edilen ITS-PCR ürünleri, etidyum bromür içeren % 1.5'luk agaroz jelde 1X TBE tamponu kullanılarak 120 V'da 3 saat yürütülüp jel görüntüleme ve analiz sisteminde görüntülenmiştir.

Çizelge 4.11. ITS-PCR reaksiyonu için uygulanan protokol

Reaksiyon bileşenleri	Miktar (µL)	Stok Konsantrasyonu
Taq Tamponu + KCl*	5 µL	10X
$MgCl_2$	5 µL	25 mM
dNTP	1 µL	10 mM
İleri primer	0.3 µL	50 pmol/µL
Geri primer	0.3 µL	50 pmol/µL
Taq DNA Polimeraz	0.3 µL	5 U/µL
Kalıp DNA	2 µL	200 ng/µL
ddH_2O	36.1 µL	-
Toplam Hacim	**50 µL**	

***100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.8**

Çizelge 4.12. ITS-PCR reaksiyon koşulları

Reaksiyon aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94°C	4 dk	1
Denatürasyon	94°C	1 dk	35 döngü
Primer bağlanması	55°C	7 dk	
Zincir uzaması	72°C	2 dk	
Son zincir uzaması	72°C	7 dk	1
	4°C	∞	1

4.2.1.4.3. Tekrarlı Palindromik $(GTG)_5$ ve BOX Dizilerinin PCR ile Çoğaltılması (*Rep*-PCR)

Tekrar eden $(GTG)_5$ ve BOX elementlerinin genomik parmak izi analizleri; $(GTG)_5$ ve BOXA1R primerleri kullanılarak Versalovic ve ark. (1994) tarafından tanımlanan PCR koşullarında gerçekleştirilmiştir (181). $(GTG)_5$-PCR ve BOX-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlere ait dizi bilgileri Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. $(GTG)_5$-PCR ve BOX-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizi bilgileri

Hedef Gen Bölgesi	Primer Dizileri (5'-3')	T_m (°C)	Referans
$(GTG)_5$	$(GTG)_5$ primer: GTGGTGGTGGTGGTG	51.6	(181)
BOXA1R	BOXA1R primer: CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	69.6	

Her iki tekrar elementi için uygulanan PCR protokolü, kullanılan primerler hariç aynı olmakla birlikte, Çizelge 4.14'de miktarları belirtilen PCR reaktifleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. $(GTG)_5$ ve BOX-PCR reaksiyon koşulları, sırasıyla Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.16'da görüldüğü gibi farklılık göstermektedir. Elde edilen BOXA1 ve $(GTG)_5$-PCR ürünleri, etidyum bromür içeren % 1.5'luk agaroz jelde 1X TBE tamponu kullanılarak 120 V'da 3 saat yürütülüp jel görüntüleme ve analiz sisteminde görüntülenmiştir.

Çizelge 4.14. $(GTG)_5$-PCR ve BOX-PCR reaksiyonları için uygulanan protokol

Reaksiyon bileşenleri	Miktar (µL)	Stok Konsantrasyonu
Gitschier tamponu	4 µL	5X
DMSO	2.5 µL	20X (% 100)
dNTP	1.26 µL	10 mM
$(GTG)_5$ /BOXA1R primer	0.3 µL	50 pmol/µL
BSA	1.25 µL	20 mg/mL
Taq DNA Polimeraz	0.21 µL	5 U/µL
Kalıp DNA	7.5 µL	200 ng/µL
ddH_2O	12.98 µL	-
Toplam Hacim	**30 µL**	

Çizelge 4.15. $(GTG)_5$-PCR reaksiyon koşulları

Reaksiyon aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94°C	7 dk	1
Denatürasyon	94°C	30 sn	30 döngü
Primer bağlanması	45°C	1 dk	
Zincir uzaması	65°C	8 dk	
Son zincir uzaması	65°C	15 dk	1
	4°C	∞	1

Çizelge 4.16. BOX-PCR reaksiyon koşulları

Reaksiyon aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95°C	7 dk	1
Denatürasyon	94°C	1 dk	30 döngü
Primer bağlanması	53°C	1 dk	
Zincir uzaması	65°C	8 dk	
Son zincir uzaması	65°C	15 dk	1
	4°C	∞	1

4.2.1.4.4. ARDRA, ITS-PCR, BOXA1-PCR ve $(GTG)_5$-PCR Reaksiyonları Sonucu Elde Edilen Moleküler Verilerin Filogenetik Analizleri

GelCompar II yazılım programı (Applied Maths, Belgium) yardımıyla, görüntülenen her bir *Alu*I, *Hae*III ve *Taq*I ARDRA bant profilleri, oluşan enzim kesim bantlarının mevcudiyeti, sayısı, yoğunluğu ve büyüklüğü bakımından ve ITS-, BOXA1- ve $(GTG)_5$-PCR DNA parmak izi profilleri ise DNA bantlarının sayısı, büyüklüğü ve yoğunluğu bakımından referans bakteriler ile karşılaştırılmış ve bakteriler % 16.7, % 33.34, % 50.0, % 66.7 ve % 83.4 değerlerindeki sınır benzerlik limitlerine göre belirli taksonomik gruplara ayrılmıştır. Bu bağlamda, % 0-16.7 değerleri arasında benzerlik gösteren bakteriler eşsiz ayırıcı bir profile sahip olanlar, % 75.0-99.9 arasında benzerlik sergileyenler benzer profile sahip olanlar ve % 100 benzerlik gösterenler de aynı bant profiline sahip olanlar olarak değerlendirilmişlerdir. İstatiksel olarak 45 bç'den büyük olan enzim kesim fragmentleri analiz edilmiştir. Belirtilen 6 farklı DNA parmak izi uygulamasındaki dijital bant profilleri arasındaki benzerlik, Pearson korelasyon katsayısı kullanılarak hesaplanmış ve UPGMA analizi ile kümeleme işlemi yapılarak, izolatlar ve referanslar arasındaki genetik ilişkinin 6 farklı parametre ile değerlendirildiği tüm test sonuçları tek bir dendogramda toplanmıştır.

4.2.2. KLASİK FENOTİPİK ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ

Tüm morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal fenotipik karakterizasyon testleri, E184aa ve E208a kodlu izolatlar ile bu izolatlara en çok 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren 12 referans suş kullanılarak ve 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. İzolatların ve referans suşların farklı pH, sıcaklık ve tuz değerlerindeki optimum üremeleri, OD 600 nm'deki spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenmiştir.

4.2.2.1. Hücre ve Koloni Morfolojileri, Hareketlilik ve Spor Oluşturma Özellikleri

Koloni morfolojileri, tüm izolat ve referans suşların Tryptic Soy Broth (TSB) sıvı besiyerinde ve MI katı besiyerinde (340, 341) 55-65°C'de 18-72 saat üretilmiş kültürleri kullanılarak belirlenmiştir. MI besiyerinde 55°C'de 18-24 saat üretilmiş kültürlerden hazırlanan preparatlar Gram boyama yapılmış ve immersiyon objektifi ile ışık mikroskobunda (Olympus CX21) incelenerek kültürlerin mikroskobik analizleri gerçekleştirilmiştir. Hücre morfolojileri ve hücre boyutları, MI katı besiyerinde 6-72 saat üretilmiş kültürlerden alınan örneklerin % 0.85'lik serum fizyolojik ile süspanse edilerek hazırlanmış preparatları ile faz kontrast mikroskobunda (Olympus BX51) incelenmiştir.

Ayrıca, faz kontrast mikroskobu ile bakterilerin spor oluşturma özelliklerine göre spor şekilleri ve pozisyonları incelenmiştir. Spor oluşumu, 55°C'de 6-48 saatlik MI katı besiyerinde üretilmiş kültürler kullanılarak belirlenmiş, spor oluşturan izolatlar spor şekli (oval, elipsoidal ve yuvarlak), vejetatif hücredeki spor pozisyonu (sentral, subterminal ve terminal) ve şişkinlik oluşturup oluşturmaması açısından incelenmiştir (358). Bakterilerin flagella boyaması, Flagella Stain Droppers kit (TermoFisher Scientific, BD 261206) içeriğine göre yapılmıştır. Flagella varlığının ve tipinin belirlenmesi için gerekli preparatları hazırlamak üzere, bakteriler MI katı besiyerinde 55ºC'de 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası üreyen kültürün bir kolonisi öze ile alınarak lam üzerine konulan 15 µL'lik deiyonize su içerisine karıştırmadan hafifçe konulmuş ve lam oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, kit kullanılarak 4 dakika süreyle flagella boyaması yapılmış ve bakterilerin flagella tipleri immersiyon objektifi altında 10x100'lük büyütmede ışık mikroskobu (Olympus CX21) ile görüntülenmiştir.

4.2.2.2. Optimum Üreme pH'sı

Optimum üreme pH'larının belirlenmesi amacıyla; pH değerleri 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5 ve 11.0 olan NaOH ya da HCl ile ayarlanmış farklı pH aralıklarındaki Nutrient Broth (NB) besiyerinde ve optimum üreme sıcaklıklarında kültürlerin 18-24 saatlik üremeleri gözlenmiştir (358).

4.2.2.3. Optimum Üreme Sıcaklığı

Optimum üreme sıcaklık değerleri, optimum pH değerine ayarlanmış NB besiyerinde 35, 37, 40, 55, 60, 65 ve 70°C'deki farklı sıcaklık aralıklarında 18-24 saatlik inkübasyon sonucunda belirlenmiştir (358).

4.2.2.4. Tuz Toleranslarının Belirlenmesi

Tuz toleranslarının belirlenmesi amacıyla, optimum sıcaklık ve pH'da bulunan NB besiyerine % 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 ve 5.0 (w/v) olacak şekilde NaCl eklenerek, kültürlerin 18-24 saatlik üremeleri gözlenmiştir (358).

4.2.2.5. Antibiyogram

Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için 10 farklı antibiyotik ile disk difüzyon testi yapılmıştır. Kullanılan antibiyotikler ve disk içerikleri (Oxoid); Kanamisin (30 µg),

Novobiosin (30 µg), Vankomisin (30 µg), Penisilin G (10 U), Neomisin (30 µg), Azitromisin (15 µg), Tetrasiklin (30 µg), Kloramfenikol (30 µg), Bazitrasin (10 U) ve Rifampisin (30 µg)'dir (358).

4.2.2.6. Biyokimyasal Testler

Tüm bakterilerin MI agar besiyerinde ön aktifleştirmeleri yapıldıktan sonra uygun besiyerlerinde katalaz ve amilaz aktiviteleri, kazein hidrolizi gibi enzim aktiviteleri ve diğer biyokimyasal testler yapılmıştır. Amilaz aktivitesi için MI agar besiyerinde 55ºC'de 24 saat üretilen kültürlere iyot çözeltisi [% 2 potasyum iyodür (KI) içinde çözülmüş % 0.2'lik iyot (I_2)] damlatılmış ve nişastanın parçalanması sonucu kolonilerinin etrafında oluşan zonun büyüklüğüne göre izolatlardaki amilaz aktivitesi belirlenmiştir. Katalaz aktivitesi, Nutrient Agar (NA) besiyerinde 55ºC'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra lam üzerinde süspanse edilen kültüre % 3'lük H_2O_2 damlatılmasıyla belirlenmiş ve hava kabarcığı oluşturan izolatlar katalaz pozitif olarak yorumlanmıştır. Kazein hidrolizi, % 5 oranında skim milk powder içeren kazein besiyerinde üretilmiş 24-48 saatlik kültürler kullanılarak belirlenmiştir (358).

API 50CH kiti (bioMérieux, Fransa) kullanılarak izolatların ve referans suşların 49 farklı karbohidrat fermentasyon testleri yapılmıştır. API 50CH kiti kapsamında uygulanan testlerde yer alan karbohidrat ailesi ve türevlerine ait (heterosidler, polialkoller, üronik asitler) substratlar; gliserol, eritritol, D-arabinoz, L-arabinoz, D-riboz, D-ksiloz, L-ksiloz, D-adonitol, metil-βD-ksilopiranozid, D-galaktoz, D-glukoz, D-fruktoz, D-mannoz, L-sorboz, L-ramnoz, dulsitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, metil-αD-mannopiranozid, metil-αD-glukopiranozid, N-asetilglukozamin, amigdalin, arbutin, eskülin (ferrik sitrat), salisin, D-sellobioz, D-maltoz, D-laktoz, D-melibioz, D-sukroz, D-trehaloz, inulin, D-melezitoz, D-rafinoz, amidon (nişasta), glikojen, ksilitol, gentibioz, D-turanoz, D-likoz, D-tagatoz, D-fukoz, L-fukoz, D-arabitol, L-arabitol, potasyum glukonat, potasyum 2-ketoglukonat ve potasyum 5-ketoglukonattır. Ayrıca, API 20E kiti (bioMérieux, Fransa) kullanılarak oksidaz ve β-galaktosidaz (ONPG) testleri, arjinin dihidrolaz, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz reaksiyonları, sitrat kullanımı, hidrojen sülfid (H_2S) üretimi, triptofan deaminaz reaksiyonu, üre kullanımı, jelatin hidrolizi, indol üretimi, asetoin üretimi (Voges Proskauer testi), nitratın nitrite (NO_2) ve azot (N_2) gazına indirgenmesi gibi çeşitli biyokimyasal testler de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen fenotipik test sonuçlarına göre izolatların fenotipik farklılıkları ortaya çıkarılmıştır (359).

4.2.3. YENİ BAKTERİ TÜRLERİ OLDUKLARI ÖNGÖRÜLEN *ANOXYBACILLUS* CİNSİ İZOLATLARIN GENOTİPİK VE KEMOTAKSONOMİK YÖNTEMLERLE TÜR SEVİYESİNDE TANIMLANMASI

16S rRNA-PCR, ARDRA, ITS-PCR, BOXA1 ve $(GTG)_5$-PCR gibi moleküler analizler ile fenotipik analizler sonucunda ortaya çıkan farklılıklara göre, E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının hangi referans türlerle DNA-DNA hibridizasyon analizlerinin yapılacağına karar verilmiştir. E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının kesin olarak tür seviyesinde tanımlanabilmesi için; gerçekleştirilen fenotipik ve bazı moleküler analizlerin yanı sıra hücre membran yapısının (toplam hücre yağ asiti, kinon ve polar lipid) ve hücre duvarında bulunan DAP (diaminopimelik asit) yapısının analizleri gibi kemotaksonomik testler ile genomik DNA'nın % G+C içeriği ve DNA-DNA hibridizasyon analizleri gibi diğer genotipik testler DSMZ Enstitüsü'nde (Almanya) hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının kesin tür teşhislerinin yapılabilmesi için elzem olan bu testlerin metodolojileri DSMZ'den temin edilmiş ve 4.2.3.1-4.2.3.4 bölümlerinde belirtilmiştir. İzolatlara DSMZ Enstitüsü'nde uygulanması talep edilen kemotaksonomik ve genotipik analizler Çizelge 4.17'de verilmiştir.

Çizelge 4.17. E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilen kemotaksonomik ve genotipik analizleri

Analizler	**E184aa**	**E208a**
Hücresel yağ asiti analizi (GLC)	X	X
Kinon analizi (HPLC)	X	X
Polar lipid analizi (TLC)	X	X
DAP analizi (TLC)	X	X
DNA baz kompozisyonu (% G+C içeriği) (HPLC)	X	X
DNA-DNA hibridizasyonu	E184aa X *A. gonensis* NCIMB 13933^T E184aa X *A. ayderensis* NCIMB 13972^T E184aa X *A. kamchatkensis* DSM 14988^T E184aa X *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T E184aa X *A. salavatliensis* DSM 22626^T	E208a X E184aa E208a X *A. gonensis* NCIMB 13933^T E208a X *A. ayderensis* NCIMB 13972^T E208a X *A. kamchatkensis* DSM 14988^T E208a X *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T E208a X *A. salavatliensis* DSM 22626^T

4.2.3.1. Hücre Membran Yapısının İncelenmesi

4.2.3.1.1. Toplam Hücre Yağ Asiti ve Kinon Analizleri

Toplam hücre yağ asiti ve kinon analizleri için 5 g yaş ağırlığında hücreye ihtiyaç duyulduğundan, öncelikle biyokütle üretimi yapılmıştır. Yağ asiti analizleri için, izolatlar Trypticase Soy Broth Agar (TSBA40)'da 55ºC'de 24 saat üretilmiştir. Miller (1982) ile Kuykendall ve ark. (1988) tarafından kullanılan yöntemin modifikasyonu yapılarak; saponifikasyon, metilasyon ve ekstraksiyon ile petri kaplarından toplanan 40 mg hücreden yağ asiti metil esterleri izole edilmiştir (360, 361). Daha sonra, yağ asiti metil esterleri karışımı bir gaz kromotografisi sistemi içeren Sherlock Microbial Identification Sistemi (MIS, MIDI Inc, Newark, USA) kullanılarak ayrılmıştır. Pikler otomatik olarak bütünleştirilmiş ve hücre bileşenindeki yağ asitlerinin adları ve yüzdeleri MIS standart yazılımı (MIDI Inc Sherlock MIS software, version 6.1) ile hesaplanmıştır.

Lipokinonlar, Tindall (1990) tarafından tanımlanan iki basamaklı yöntem kullanılarak 100 mg liyofilize hücre materyalinden ekstrakte edilmiştir. Solunum kinonları, metanol:hekzan kullanılarak ekstrakte edilmiş ve ardından hekzan içerisinde faz ayrımı gerçekleştirilmiştir. Solunum kinonları, çözücü olarak hekzan:metil tersiyer bütil eter (9:1, v/v) kullanılarak silika jel ince tabaka kromatografisi (TLC, Macherey-Nagel Art. No. 805 023) ile farklı sınıflara ayrılmıştır. Farklı kinon sınıflarına karşılık gelen UV emici bantlar (örn. menakinonlar ya da ubikinonlar) plakadan çıkarılmış ve seyreltici olarak metanol:heptan (9:1, v/v) kullanılarak terz faz kolonlu bir LDC Analitik HPLC (Thermo Separation Products) cihazı ile analiz edilmiştir. Solunum lipokinonları 269 nm'de tespit edilmiştir (362, 363).

4.2.3.1.2. Polar Lipid Analizi

Polar lipidlerin analizinde 100 mg liyofilize hücre materyali kullanılmış olup, polar lipidler kloroform:metanol:% 0.3'lük sıvı NaCl karışımı 1:2:0.8 (v/v/v) kullanılarak ve Bligh ve Dyer (1959) çalışmasında kullanılan yöntemin (364) modifikasyonu ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsü bir gece karıştırılmış ve hücre atığı santrifüj ile uzaklaştırılmıştır. Kloroform:metanol:% 0.3'lük sıvı NaCl karışımının oranı 1:1:0.9 (v/v/v)'a ayarlandıktan sonra, polar lipidler kloroform fazı içinde geri kazanılmıştır. Polar lipidler, iki boyutlu silika jel ince tabaka kromatografisi (TLC) (Macherey-Nagel Art. No. 818 135) ile ayrılmıştır. İlk olarak kloroform:metanol:su (65:25:4, v/v/v) ve ikinci olarak

da kloroform:metanol:asetik asit:su (80:12:15:4, v/v/v/v) karışımı uygulanmıştır. Toplam lipid materyali ve spesifik fonksiyonel gruplar; molibdatofosforik asit (toplam lipitler), Zinzadze reaktifi (fosfat), ninhidrin (serbest amino groupları), periyodik asit-Schiff (PAS) (α-glikoller), Dragendorff (dördüncül nitrojen) ve α-naftol-sülfirik asit (glikolipitler) kullanılarak belirlenmiştir (365).

4.2.3.2. Diaminopimelik Asit (DAP) İçeriğinin Belirlenmesi

İzolatların 5 mg'lık liyofilize hücrelerinden elde edilen toplam hücre hidrolizatlarında (4N HCl, 100°C, 15 saat) Dpm (2,6-diaminopimelik asit) izomerlerinin ya da OH-Dpm (2,6-diamino-3-hidroksipimelik asit) varlığı, TLC ile selüloz plakalar üzerinde incelenmiştir (163).

4.2.3.3. % G+C İçeriğinin Belirlenmesi

Genomik DNA'nın % G+C içeriğinin belirlenmesi için DSMZ'de uygulanan metoda göre; öncelikle French press cihazı (Constant systems TS-Series 0.75 KW French press, IUL Instruments) kullanılarak hücre lize edilip hidroksiapatit ile DNA izolasyonu yapılmıştır (366). DNA degradasyonu için saflaştırılan bakteri DNA'sı P1 nükleaz ile sindirildikten sonra nükleotidler bovine alkalen fosfataz ile defosforilize edilmiştir (223). HPLC sistemi (Shimadzu) ile pH 4.4'lük 0,3 M [$(NH_4)H_2PO_4$/asetonitril (40:1) (v/v)] çözücüsü kullanılarak hazırlanmış defosforile DNA içeriği kolondan geçirilmiştir (367). İşlem sonunda % G+C değerleri, deoksiguanozin (dG) ve deoksitimidin (dT) oranına bağlı olarak hesaplanmıştır (223). Kalibrasyon, referans DNA olarak metillenmemiş Lambda-DNA (GC içeriği: 49.858 % mol) (223) ile *B. subtilis* DSM 402 (GC içeriği: 43.518 % mol), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* DSM 3586 (GC içeriği: 65.069 % mol) ve *Streptomyces violaceoruber* DSM 40783 (GC içeriği: 72.119 % mol) suşlarına ait DNA'lar kullanılarak yapılmıştır.

4.2.3.4. DNA-DNA Hibridizasyon Analizleri

DNA-DNA hibridizasyon analizi için çaprazlanması istenilen her bir izolat ve referans şus öncelikle hibridizasyon işlemi için hazırlanmıştır. Bunun için DNA, French pressure aleti kullanılarak hücreden izole edilmiş ve hidroksiapatit ile kromatografik olarak saflaştırılmıştır (366). Analizler için *in-situ* sıcaklık probu ve sıcaklık kontrol sistemi

içeren UV/VIS özel bir spektrofotometre kullanılmış ve deneyler 2X SSC (tuzlu sodyum sitrat) tamponunda 68°C'de yürütülmüştür (225, 368).

4.2.4. α-AMİLAZ AKTİVİTESİNİN KALİTATİF VE KANTİTATİF TAYİNİ

4.2.4.1. α-Amilaz Aktivitesinin Kalitatif Tayini

Tür teşhisi yapılacak E184aa ve E208a kodlu izolatlar ile A3210, A321, D222b ve E184ab kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının yanı sıra, 18 *Anoxybacillus* referans suşunun kalitatif α-amilaz aktiviteleri, % 1 çözünür nişasta içeren MI agar besiyerinde 55ºC'de 24 saat üretilen kültürlere iyot çözeltisi [% 2 potasyum iyodür (KI) içinde çözülmüş % 0.2'lik iyot (I_2)] damlatılarak incelenmiştir. Bu işlem sonucunda, koloni etrafında nişasta parçalanması sonucu oluşan zonun büyüklüğüne göre izolatlardaki amilaz aktivitesi -, ⊥, +, ++, +++ ve ++++ şeklinde değerlendirilmiş ve kolonisi etrafında 2 cm'den büyük zon oluşturan (≥ ++) bakteriler yüksek amilolitik aktiviteye sahip izolatlar olarak belirlenmiştir (358). Ayrıca, çalışmalarda dış grup olarak *Geobacillus* cinsini temsilen *G. stearothermophilus* DSM 22^T ve *Bacillus* cinsini temsilen de *B. amyloliquefaciens* DSM 7^T referans suşları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm *Anoxybacillus* izolatları ve referans türlerin kalitatif olarak tespit edilen α-amilaz aktivite zonları ve oluşan zonların büyüklüğüne göre α-amilaz aktivitelerinin değerlendirilmesi yapılmış ve yüksek amilolitik aktiviteye sahip basiller, kantitatif amilaz aktivitesi analizine alınmıştır.

4.2.4.2. α-Amilaz Aktivitesinin Kantitatif Tayini

4.2.4.2.1. Kalitatif Olarak Amilolitik Aktivite Gösteren Basillerde Hücre Dışı Amilaz Üretimi

6 *Anoxybacillus* izolatı (A321, A3210, D222b, E184aa, E184ab ve E208a) ve 20 referans türün hücre dışı α-amilaz aktiviteleri, substrat olarak çözünebilir nişastayı hidroliz edebilme yeteneklerine göre spektrofotometrik ölçümler neticesinde kantitatif olarak belirlenmiştir (369). Öncelikle tüm izolatların ve referans türlerin % 1 çözünür nişasta içeren MI besiyerinde 55ºC'de 18 saat üretilen kültürleri, % 0.85 steril serum fizyolojik içerisine inoküle edilerek, OD 660 nm'de absorbansları 0.2-0.4 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu bakteri süspansiyonundan 500 µL alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde 3 farklı 5 mL'lik modifiye Santos ve Martins (2003) enzim üretim besiyerine (342) inoküle edilmiş ve her bir bakteri 150 rpm'de 72 saat inkübe edilmiştir. Besiyerinin sıcaklığı (sadece *B. amyloliquefaciens* DSM 7^T referans türü için 37°C olmak üzere 55-65ºC) ve

pH'sı (pH 6.5-8.0) her bir bakterinin optimum sıcaklık ve pH isteğine göre ayarlanmıştır. 72 saatte üretilen kültürler, daha önceden darası alınmış steril ependorflara alınarak, 4ºC'de 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Her bir bakteri kültüründen elde edilen süpernatant, hücre dışı enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere steril cam tüplere aktarılmıştır. Santrifüj sonrası darası alınmış ependorfların dibinde kalan bakteri pelletlerinin ise fazla suyu alınarak, bakterilerin yaş ağırlıkları ölçülüp mg cinsinden hücre miktarları hesaplanmıştır.

4.2.4.2.2. Maltozun Ekstinksiyon Katsayısının Hesaplanması

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan maltozun ekstinksiyon katsayısının belirlenmesi için 50 mg/mL stok maltoz dH_2O'da çözülmüştür. Bu stok çözeltiden, fosfat tamponu (pH:7.0) kullanılarak 0.1-2.5 mg/mL olacak şekilde dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlara 1 mL DNS eklenerek 5 dakika kaynatılmıştır. Tüpler soğuduktan sonra 540 nm dalga boyunda optik yoğunluğu ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine karşı mM standart maltoz konsantrasyon eğrisinin eğiminden ekstinksiyon katsayısı hesaplanmıştır (17). Maltozun ekstinksiyon katsayısı, bakteriye göre değişen uygun pH ve sıcaklık değerlerine göre L/mM.cm cinsinden belirlenmiştir (örn. ϵ_{540nm} =1.454 L/mM.cm, pH 7.0, 65°C).

4.2.4.2.3. Kantitatif α-Amilaz Aktivite Tayini

Hücre dışı α-amilaz aktivitesinin tayin edildiği standart reaksiyon karışımı, enzime göre değişen uygun pH değerine göre ayarlanmış 0.5 mL 0.2 M sodyum fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış % 2'lik çözünür nişasta çözeltisine, gerektiğinde dilüsyona uğratılmış 0.5 mL enzim çözeltisinin eklenmesi ile hazırlanmıştır. Enzim ilavesi sonucunda, her bir enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri dikkate alınarak, 55-65°C arasında değişen sıcaklıklarda (sadece *B. amyloliquefaciens* DSM 7^T referans türü için 37°C) 10 dakika inkübe edilen karışımdaki reaksiyon, 1 mL 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) ayıracı eklenerek durdurulmuş ve daha sonra karışım, renk reaksiyonunun oluşması için 5 dakika süreyle kaynatılmıştır. Tüm reaksiyon tüpleri soğutulduktan sonra, α-amilaz aktivitesi 540 nm dalga boyunda UV visible mikroplate okuyucuda (BioTek) köre karşı absorbans değerleri kaydedilerek ölçülmüştür. Spektrofotometrik ölçümde, 0.5 mL substrat çözeltisi, 0.5 mL sodyum fosfat tamponu ve 1 mL DNS ayıracı kullanılarak hazırlanan köre karşı okuma yaptırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda maltozun kullanıldığı standart eğriye göre amilaz aktivitesi sonucunda hidroliz edilen maltoz oranı belirlenmiştir. α-

Amilaz aktivite deneyleri, 3 paralel olarak çalışılan her bir test tüpünün 3 kez tekrarlanan reaksiyon sonuçlarının ortalama değerlerinin alınmasıyla hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, her bir bakterinin α-amilaz aktivitesine ait üç farklı absorbans değerinin ortalaması alınmış ve enzim aktivitesi öncelikle U/mL cinsinden hesaplanmıştır. İzolatların amilaz üretimlerini karşılaştırabilmek amacıyla, her bir tüpün amilaz aktivitesi kendine ait pelet ağırlığına bölünerek U/g cinsinden hesaplama yapılmış ve böylece izolatların hücre yaş ağırlıklarına bağlı olarak oluşturdukları amilaz aktivitelerine göre bir dizin oluşturulmuştur. Sonrasında, bakterilerin ortalama kantitatif α-amilaz aktivitesi (U/mL) ve ortalama enzim aktivitesi/biyokütle (U/g) değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve en yüksek enzim üreticisinden en düşüğe doğru sıralanmışlardır.

4.2.4.2.4. Enzim Ünitesinin Tanımı

Bir ünite (U) α-amilaz, standart deney koşullarında dakikada 1 µmol indirgen şeker (maltoz) açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmış ve enzim aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Ünite/mL enzim} = \frac{\Delta OD \times V_f \times D_f}{\epsilon_{540nm} \times t \times b \times V_e}$$

OD = Optik yoğunluk

$\Delta OD = OD_{540nm}$ Örnek-OD_{540nm} Kör

V_f = Tüpte hazırlanan toplam hacim (2 mL)

D_f = Dilüsyon faktörü

ϵ_{540nm} = Uygulanan reaksiyon koşullarında maltozun 540 nm'deki ekstinksiyon katsayısı (L/mM.cm)

t = Reaksiyon zamanı (10 dakika)

b = Küvetin ışık geçiş yolu (1 cm)

V_e = Küvette okutulan reaksiyon karışımındaki enzim hacmi (0.5 mL) (370)

4.2.5. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ GEN BÖLGELERİNİN MOLEKÜLER, FİLOGENETİK VE *IN SİLİKO* TEKNİKLERLE ANALİZLERİ

4.2.5.1. α-Amilaz ve Siklodekstrin Glukanotransferaz Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması ve Dizi Analizleri

Yüksek amilolitik aktivite gösteren 6 *Anoxybacillus* izolatı (A321, A3210, D222b, E184aa, E184ab ve E208a) ve 20 referans tür olmak üzere toplam 26 bakterinin α-amilaz gen bölgeleri, PCR reaksiyonları ile çoğaltılmıştır. *B. amyloliquefaciens* DSM 7^T ve *G. stearothermophilus* DSM 22^T referans suşları, çalışmaya farklı cinslere ait amilaz üreticisi suşlar olduklarından pozitif kontrol olarak dahil edilmişlerdir. 1.518 bç uzunluğundaki α-amilaz gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması için, Chai ve ark. (2012) tarafından bakteriyel amilazların korunmuş gen bölgelerine göre tasarlanmış primerler (***amy*** ileri ve geri primerler) kullanılmıştır (18). Tüm amilaz genini çoğaltmayı hedefleyen bu primerlerin, mevcut *Anoxybacillus* türlerine ait genom dizilerinin BLAST analizleriyle (346) karşılaştırılması yapılmış ve primerlerin bu gen bölgesine uygunluk gösterdikleri tespit edilmiştir. Belirlenen α-amilaz gen bölgelerinin çoğaltılamadığı durumlarda, yine Chai ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada kullanılan ve bakteriyel amilazların korunmuş gen bölgelerine göre dizayn edilmiş ve yaklaşık 800 bç'lik bir gen bölgesini çoğaltabilen dejenere primerler (***d-amy*** ileri ve geri primerler) kullanılmıştır (18). Bunların yanı sıra, amy primeri ile çoğaltılamayan *A. rupiensis* DSM 17127^T ve *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T referans genleri d-amy dejenere primeri ile yaklaşık 800 bç kadar çoğaltılıp dizilenmiştir. Dizileme sonrası gerçekleştirilen BLASTN taraması sonucunda, her iki bakteriye ait gen dizilerinin en çok *B. stearothermophilus* siklodekstrin glukanotransferaz genlerine ve NCBI-korunmuş domain taraması (Conserved Domain Search Service-CDS) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi, 347) sonucunda ise diğer amilaz gen dizilerimizden farklı olarak, AmyAc_AmyMalt_CGTase_like (cd11320) korunmuş protein domainine benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında, *A. rupiensis* DSM 17127^T ve *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T referans suşlarının, dizilenmesi hedeflenen amilaz genleri yerine siklodekstrin glukanotransferaz genlerinin çoğaltıldığı belirlenmiştir. Bu nedenle, *Anoxybacillus* cinsine ait bir siklodekstrin glukanotransferaz genini (GenBank aksesyon numarası: CP015435.1) hedef alarak ***cgt*** olarak adlandırdığımız ve d-amy primeri ile yaklaşık ilk 800 bç'lik bölgesinin dizilenebildiği bu genin 735-2136 bç'lik downstreamdeki geri kalan kısmını çoğaltabilen bir primer çifti Primer3web (version

4.0) programı (http://primer3.ut.ee; 343, 344) kullanılarak tasarlanmıştır. α-Amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz genlerinin çoğaltıldığı PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlere ait dizi bilgileri Çizelge 4.18'da verilmiştir.

Çizelge 4.18. α-Amilaz-PCR ve siklodekstrin glukanotransferaz-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizi bilgileri

Primer adı	**Hedef Gen Bölgesi**	**Primer Dizileri (5'-3')**	**Amplikon (bç)**	**T_m (°C)**	**Organizma (GenBank Aksesyon No)**	**Referans**
amy	α-amilaz	İleri primer: AAACGTGTATTTCGCGCGC	1518	57.3	*Anoxybacillus* sp. SK3-4 (JF932307.1)	(18)
		Geri primer: TGATGCTTTTCGTTTACGCGC		59.4		
d-amy*	α-amilaz	İleri primer: GGNGGNGAYTGGCARGGN	~800	67		
		Geri primer: CATRTCRTGRTTRTCDATRAA		58		
cgt	siklodekstrin glukanotransferaz	İleri primer: GATTTTCGTTTCGGACAAAAG	1019	55.5	*Anoxybacillus* sp. B2M1 (CP015435.1)	bu tez
		Geri primer: AACATTGCCACTTCCGTCTT		56.4		

* N: A + C + G + T; Y: C + T; R: A + G; D: G + A + T

Chai ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada (18) önerilen PCR koşulları, öncelikle primer çiftinin bağlanma ısısı (T_m) için 52-54-55-56-58-60-62-64°C sıcaklık değerlerinde ve 50 µL'lik toplam reaksiyon hacminde 1.5, 2.0 veya 2.5 mM'lık son $MgCl_2$ konsantrasyonu kullanılarak gradient PCR reaksiyonları ile optimize edilmiştir. α-Amilaz-PCR reaksiyonları, kullanılan primer çiftinin bağlanma ısısı, bakteriye göre değişmekle birlikte, 55°C ya da 58°C ve $MgCl_2$ son konsantrasyonu 2.0 ya da 2.5 mM olacak şekilde; siklodekstrin glukanotransferaz-PCR reaksiyonları ise primer çiftinin T_m değeri 52°C ya da 55°C ve $MgCl_2$ son konsantrasyonu 2.0 ya da 2.5 mM olacak şekilde sırasıyla Çizelge 4.19 ve Çizelge 4.20'de miktarları belirtilen PCR reaktifleri ve Çizelge 4.21'de verilen reaksiyon koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri, % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazında görüntülenmiş, PCR ekstraksiyon kiti (Fermentas, K0702) ile saflaştırılmış ve daha sonra pürifiye amplikonların çift yönlü dizi analizi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.19. α-Amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz genlerinin çoğaltılması için uygulanan PCR protokolü *($MgCl_2$ son konsantrasyonu 2 mM)*

Reaksiyon bileşenleri	Miktar (µL)	Stok Konsantrasyonu
Taq Tamponu + KCl*	5 µL	10X
$MgCl_2$	4 µL	25 mM
dNTP	0.5 µL	20 mM
İleri primer	1 µL	20 pmol/µL
Geri primer	1 µL	20 pmol/µL
Taq DNA Polimeraz	0.3 µL	5 U/µL
Kalıp DNA	1.5 µL	200 ng/µL
ddH_2O	36.7 µL	-
Toplam Hacim	**50 µL**	

***100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.8**

Çizelge 4.20. α-Amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz genlerinin çoğaltılması için uygulanan PCR protokolü *($MgCl_2$ son konsantrasyonu 2.5 mM)*

Reaksiyon bileşenleri	Miktar (µL)	Stok Konsantrasyonu
Taq Tamponu + KCl*	5 µL	10X
$MgCl_2$	5 µL	25 mM
dNTP	0.5 µL	20 mM
İleri primer	1 µL	20 pmol/µL
Geri primer	1 µL	20 pmol/µL
Taq DNA Polimeraz	0.3 µL	5 U/µL
Kalıp DNA	1.5 µL	200 ng/µL
ddH_2O	35.7 µL	-
Toplam Hacim	**50 µL**	

***100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.8**

Çizelge 4.21. α-Amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz geninin çoğaltılması için uygulanan PCR reaksiyon koşulları

Reaksiyon aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	95°C	1 dk	30 döngü
Primer bağlanması	55°C ya da 58°C **(amy)** 52°C ya da 55°C **(cgt)**	50 sn	
Zincir uzaması	72°C	1.5 dk	
Son zincir uzaması	72°C	5 dk	1
	4°C	∞	1

4.2.5.2. α-Amilaz ve Siklodekstrin Glukanotransferaz Genlerinin Annotasyonu ve GenBank Aksesyon Numaralarının Temini

Hizmet alımı şeklinde ileri ve geri primerlerle dizilenen her bir gene ait ikili ABI-kromatogramları, öncelikle oluşan baz piklerinin doğrulukları ve okumaların kalitesine bakılarak Geneious R10 programında (345) ön değerlendirilmeye alınmışlardır. Kromatogramları iyi kalitede olmayan gen dizileri yeniden dizilenmiştir. Dizileme kalitesi yüksek kromatogramlardaki ileri ve geri primer dizilerini içeren her bir gen dizisi, Geneious R10 programında bulunan ClustalW uygulamasıyla (354) hizalanmış ve ileri ve geri primerler çakıştırılarak her bir gene ait tam bir DNA dizisi elde edilmiştir.

Protein kodlayan bir gen için GenBank (97) veri tabanından aksesyon numarası alabilmek amacıyla;

- ilgili genin tüm/kısmi dizisinin,
- açık okuma çerçevesinin (ORF),
- varsa başlangıç ve stop kodonlarının,
- GenBank veri tabanında mevcut benzer gen/enzimleri kodlayan diğer gen/amino asit dizileriyle karşılaştırmalarının,
- gen dizisine bağlı olarak elde edilen olası amino asit dizilerinin,
- bağlı bulunduğu enzim süperfamilyasına ait korunmuş dizi bölgelerinin varlığının,
- bu bölgeler bakımından en çok hangi enzim familyasına benzerlik gösterdiklerinin,
- dizi bilgisinde varsa mevcut aktif/katalitik bölgelerinin belirlenmesi, yani kısaca genin CDS (Conserved Domain Search-korunmuş domain araması) annotasyonunun gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu kapsamda, öncelikle hizalanarak birleştirilen gen dizileri, NCBI-BLASTN/BLASTP programları yardımıyla GenBank veri tabanında mevcut referans suşlara ait α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz enzimlerini kodlayan gen/amino asit dizileri karşılaştırılarak aralarındaki gen/amino asit dizisi benzerlik oranları belirlenmiştir. Sonrasında ise gen dizilerimize en çok benzerlik gösteren *Anoxybacillus* cinsine ait referans gen dizileri kıyaslama amacıyla bundan sonraki çalışmalara dahil edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm genlerin olası amino asit dizileri, Mega 6 programı (348) ile standart genetik koda göre olası amino asit diline çevrilmiştir. ORF koordinatlarının tespitinden sonra gen dizilerinin translasyonu yapılmıştır. Daha sonrasında ise NCBI-conserved domain arama programı (347) kullanılarak, elde edilen olası amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz enzim proteinlerinin amino asit dizilerinde;

amilaz süperfamilyasına ait korunmuş dizi bölgelerinin mevcudiyeti, en çok hangi α-amilaz familyasına ait enzim(ler)e benzerlik gösterdikleri ve olası aktif/katalitik bölgeleri belirlenmiştir. Ayrıca, NCBI-BLASTN programı yardımıyla kodlama bölgelerinin annotasyon çalışmaları yürütülmüştür. Son olarak da elde edilen nihai gen dizileri ve yapısal analizler neticesinde, GenBank veri tabanına (NCBI-Banklt) (350) başvurularak her bir α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz gen dizisine aksesyon numarası temin edilmiştir.

4.2.5.3. α-Amilaz ve Siklodekstrin Glukanotransferaz Amino Asit Dizilerinin Filogenetik Analizleri

BLASTP programı yardımıyla GenBank veri tabanında *Anoxybacillus* cinsine ait mevcut referans suşların α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz enzimlerine ait protein dizileri saptanmış ve kendi dizilerimizle aralarındaki amino asit dizisi benzerlik oranları belirlenmiştir. Tez kapsamında elde edilen dizilerle, en çok benzerlik gösteren referans protein dizileri Genious R10 programında yer alan ClustalW uygulamasıyla hizalanmış ve filogenetik ağaç, yine Geneious programında 1000 bootstrap numunelemesi ile Jukes-Cantor genetik mesafe modellemesine (371) göre Neighbour-joining ağaç oluşturma metodu kullanılarak oluşturulmuştur (345).

4.2.5.4. α-Amilaz ve Siklodekstrin Glukanotransferaz Amino Asit Dizilerinin *In Siliko* Tekniklerle Analizleri

Korunmuş domain ve gen annotasyon çalışmaları neticesinde, olası amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz protein dizilerinde belirlenen korunmuş domainler ve katalitik bölgeler, Clustal OMEGA programı (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/, 349) kullanılarak alt alta eşleştirilmiştir. Kendi dizilerimize en çok benzerlik gösteren, GenBank'taki bazı amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz protein dizileri de karşılaştırma amacıyla bu eşleştirmeye dahil edilmiştir. Son olarak, bu referans diziler ile kendi amilaz/CGTaz protein dizilerimiz hizalanarak, belirlenen korunmuş domainler ve aktif/katalitik bölgelerdeki amino asit kökleri işaretlenerek gösterilmiştir. Ayrıca, WebLogo 3.5.0 programı (http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi, 351) yardımıyla, sadece *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz proteinlerine ait çoklu hizalanmış amino asit dizileri kullanılarak, korunmuş dizi bölgelerinin tek tek ve toplu halde gösterildiği dizi logoları oluşturulmuştur.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu bölümde, tez çalışmasının ilk basamağı olan E184aa ve E208a kodlu, α-amilaz üreticisi termofilik *Anoxybacillus* izolatlarının fenotipik, kemotaksonomik ve genotipik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan tüm analiz sonuçları ile tezin ikinci basamağı olan izolatların ve referans suşların α-amilaz aktivitesinin kalitatif ve kantitatif analiz sonuçları ve GH13 familyasına dahil α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz genlerinin dizilenmesi sonrasında gerçekleştirilen filogenetik ve *in siliko* analizlere ait bulgular sunulmuştur.

5.1. GENOTİPİK ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK GERÇEKLEŞTİRİLEN ANALİZLERİN SONUÇLARI

5.1.1. GENOMİK DNA İZOLASYONU

16S rRNA genlerinin dizilenmesi (sadece 6 izolat), ARDRA, ITS-PCR ve *Rep*-PCR analizleri ile α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz genlerinin dizilenmesinde, tez kapsamında çalışılan bakterilerden izole edilen genomik DNA'lar kullanılmıştır. Tüm *Anoxybacillus* izolatlarından ve referans suşlardan izole edilen DNA moleküllerinin miktarları (ng/µL) ile 260/280 ve 260/230 oranları Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Tez kapsamında çalışılan tüm *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin DNA konsantrasyonları

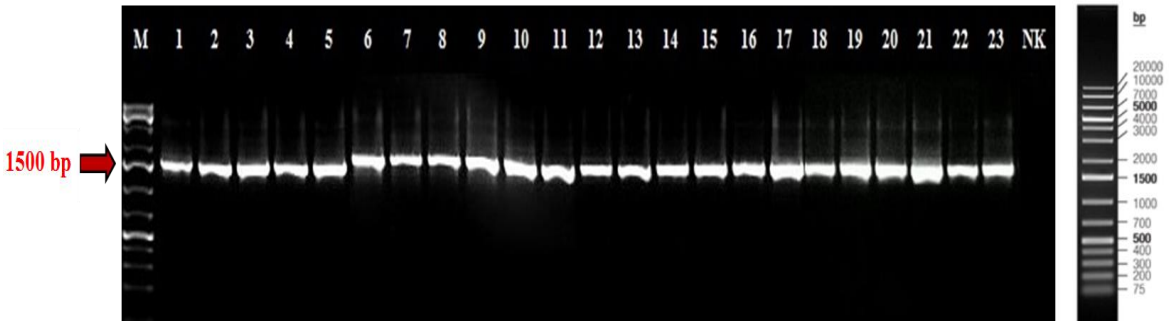
Sıra No	İzolat Kodu/Tür Adı	DNA konsantrasyonu (ng/µL)	A260	A280	A260/A280	A260/A230
1	E184aa	1838,55	37,185	18,777	1,99	2,43
2	E208a	880,9	17,618	9,335	1,89	2,02
3	A321	1129,8	22,597	11,647	1,94	2,20
4	A3120	426,5	8,529	4,585	1,86	2,02
5	D222b	776,9	15,537	8,398	1,85	2,09
6	E184ab	1665,5	33,309	16,822	1,98	2,13
7	*A. salavatliensis* DSM 22626^T	1717,8	34,356	17,038	2,02	2,44
8	*A. calidus* DSM 25220^T	501,1	9,899	5,145	1,92	1,90
9	*A. gonensis* NCIMB 13933^T	1810,7	35,712	17,449	2,03	2,31
10	*A. ayderensis* NCIMB 13972^T	1531,4	30,627	15,137	2,02	2,52
11	*A. kestanbolensis* NCIMB 13971^T	1736,25	34,920	17,431	1,99	2,28
12	*A. flavithermus* DSM 2641^T	1272,95	24,850	12,022	2,02	2,28
13	*A. kamchatkensis* DSM 14988^T	234,9	4,698	2,350	2,00	2,37
14	*A. amylolyticus* DSM 15939^T	3444,75	68,791	34,131	2,02	2,49
15	*A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T	806,3	16,126	8,543	1,89	2,32

Çizelge 5.1. (devam)

Sıra No	İzolat Kodu/Tür Adı	DNA konsantrasyonu (ng/µL)	A260	A280	A260/A280	A260/A230
16	*A. tepidamans* DSM 16325^T	3004,8	61,256	31,441	1,98	2,13
17	*A. thermarum* DSM 17141^T	511,5	10,229	5,320	1,92	2,30
18	*A. rupiensis* DSM 17127^T	706,2	13,641	7,183	1,90	2,18
19	*A. voinovskiensis* DSM 17075^T	620,15	12,445	6,497	1,93	2,00
20	*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T	1010,8	20,215	10,227	1,98	2,36
21	*A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T	352,4	7,048	3,636	1,94	1,94
22	*A. mongoliensis* DSM 19169^T	885,1	17,702	9,049	1,96	2,15
23	*A. suryakundensis* DSM 27374^T	359,5	7,171	3,708	1,94	2,17
24	*A. kaynarcensis* DSM 21706^T	1314,5	26,290	13,501	1,95	2,36
25	*G. stearothermophilus* DSM 22^T	1271,5	25,261	12,601	2,00	2,46
26	*G. thermoglucosidans* DSM 2542^T	1150,8	23,015	11,895	1,93	2,39
27	*B. amyloliquefaciens* DSM 7^T	820,7	16,464	8,443	1,96	2,33

5.1.2. 16S rRNA GENİNİN PCR İLE ÇOĞALTILMASI

E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin 27F ve 1492R primerleri kullanılarak elde edilen 16S rRNA-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 5.1'de sunulmaktadır. Tez kapsamında, aynı zamanda ARDRA analizlerinde de kullanılacak 16S rRNA genleri, sadece Çizelge 5.2'de sunulan ve ön çalışmalarda da kullanılan 6 izolat için doğrulama amacıyla yeniden dizilenmiştir.



Şekil 5.1. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin 27F ve 1492R primerleri kullanılarak elde edilen 16S rRNA-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi [1) **E184aa**; 2) **E208a**; 3) *A. salavatliensis* (DSM 22626^T); 4) *A. calidus* (DSM 25220^T); 5) *G. stearothermophilus* (DSM 22^T); 6) *G. thermoglucosidans* (DSM 2542^T); 7) *A. gonensis* (NCIMB 13933^T); 8) *A. ayderensis* (NCIMB 13972^T); 9) *A. kestanbolensis* (NCIMB 13971^T); 10) *A. flavithermus* (DSM 2641^T); 11) *B. amyloliquefaciens* (DSM 7^T); 12) *A. kamchatkensis* (DSM 14988^T); 13) *A. amylolyticus* (DSM 15939^T); 14) *A. caldiproteolyticus* (DSM 15730^T); 15) *A. tepidamans* (DSM 16325^T); 16) *A. thermarum* (DSM 17141^T); 17) *A. rupiensis* (DSM 17127^T); 18) *A. voinovskiensis* (DSM 17075^T); 19) *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (DSM 18475^T); 20) *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* (KCTC 13759^T); 21) *A. mongoliensis* (DSM 19169^T); 22) *A. suryakundensis* (DSM 27374^T); 23) *A. kaynarcensis* (DSM 21706^T); NK: Negatif kontrol; M: Marker (Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder; 75-20000 bç)]

Anoxybacillus izolatlarına ait 16S rRNA PCR ürünleri ekstraksiyon kiti ile saflaştırılmış ve saflaştırılan amplikonların çift yönlü dizi analizi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Dizileme çalışmaları sonrası yaklaşık 1500 bç'lik 16S rRNA gen dizileri elde edilmiştir. Tekrarlanan DNA dizi analizinden elde edilen 16S rRNA gen dizileri, ön çalışmalardaki bulgularla karşılaştırılarak yeni kromatogramları incelenmiş, gerekli durumlarda düzeltmeler yapıldıktan sonra her bir dizi Gen Bankası veri tabanındaki mevcut aksesyon numaraları altında güncellenmiştir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. *Anoxybacillus* cinsi izolatların 16S rRNA gen dizi uzunlukları ve güncellenmiş GenBank aksesyon numaraları

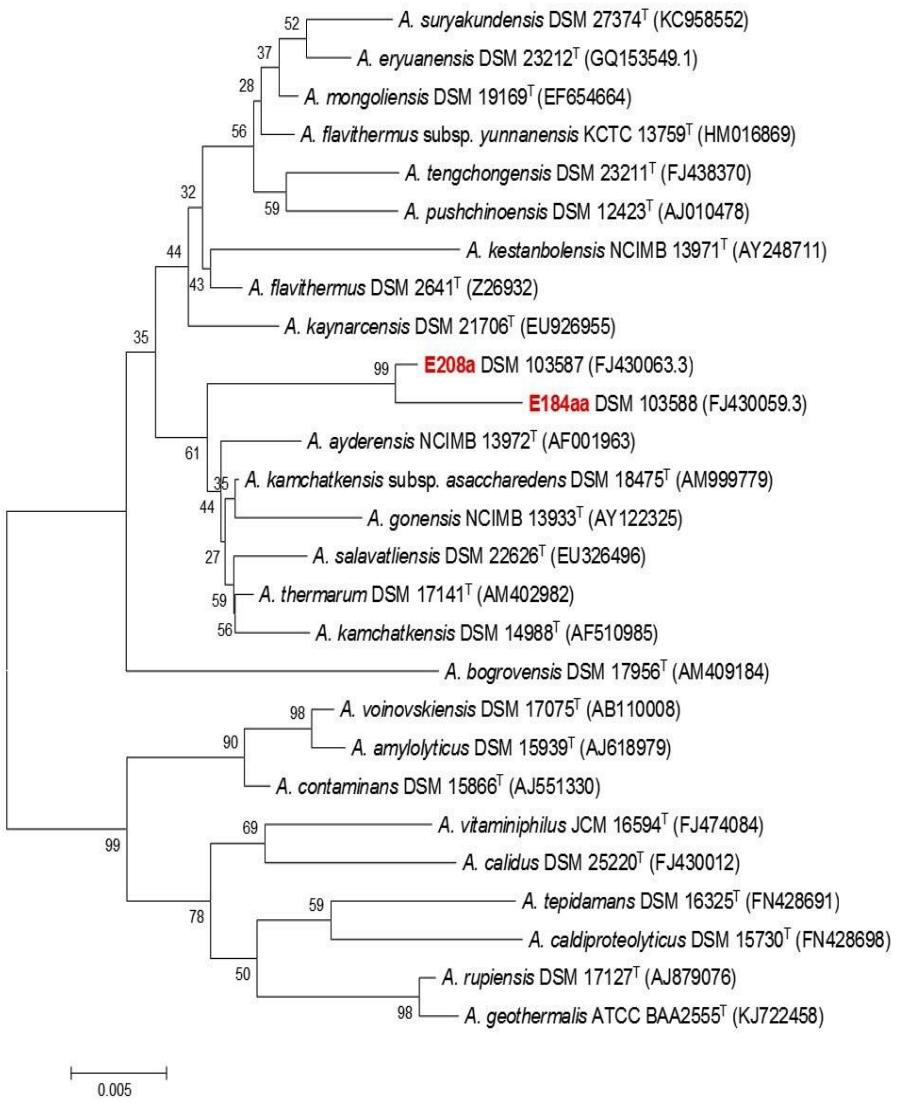
İzolat Kodu	Tür adı	16S rRNA gen dizi uzunluğu (bç)	16S rRNA GenBank Aksesyon Numarası
E184aa	*Anoxybacillus* sp.	1426	FJ430059.3
E208a	*Anoxybacillus* sp.	1426	FJ430063.3
E184ab	*Anoxybacillus* sp.	1464	FJ429585.2
A321	*Anoxybacillus* sp.	1401	FJ429993.3
A3210	*Anoxybacillus* sp.	1407	FJ429569.3
D222b	*Anoxybacillus* sp.	1462	FJ429576.2

5.1.3. 16S rRNA GEN DİZİLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZLERİ

Üç kez tekrarlanan dizi analizleri neticesinde elde edilen 16S rRNA gen dizilerinin benzerlikleri ve kromatogramların doğrulukları teyit edildikten sonra, BLASTN dizi eşleştirme programı yardımıyla GenBank ve EzBioCloud veri tabanlarında mevcut olan referans suşlara ait dizilerle karşılaştırılarak, E184aa ve E208a kodlu izolatların en çok benzerlik gösterdikleri akraba referans türlerle 16S rRNA gen dizi benzerlik oranları belirlenmiştir. Sonrasında ise literatürde tanımlanmış tüm *Anoxybacillus* referans türleri ile E184aa ve E208a kodlu izolatların 16S rRNA genlerinin Mega 6 programı (348) kullanılarak Neighbour-joining metodu (356) ile evrimsel uzaklık matriksleri hesaplanmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Diziler arasındaki evrimsel uzaklık matriksi, Kimura 2-parametre metodu temel alınarak hesaplanmıştır (355). Neighbour-joining metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç, 1000 bootstrap numunelemesi (357) ile Mega 6 programında değerlendirilmiştir. Dallanma noktalarında % 27 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir (357). Bar her 100 nükleotid pozisyonundaki 0.005'lik yer değişikliğini işaret etmektedir. E184aa ve E208a izolatlarının en çok benzerlik gösterdikleri *Anoxybacillus* cinsine ait referans türlerle 16S rRNA gen dizi benzerlik oranları Çizelge 5.3'te, evrimsel uzaklıklarını gösteren filogenetik ağaç ise Şekil 5.2'de sunulmuştur.

Çizelge 5.3. E184aa ve E208a kodlu izolatların en çok benzerlik gösterdikleri *Anoxybacillus* cinsine ait referans türlerle 16S rRNA gen dizi benzerlik oranları

Referans türler	**16S rRNA gen dizi benzerliği (%)**	
	E184aa	**E208a**
E184aa	100	**99.4**
***A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T**	**98.1**	**98.7**
***A. salavatliensis* DSM 22626^T**	**97.9**	**98.2**
***A. kamchatkensis* DSM 14988^T**	**97.6**	**98.2**
***A. ayderensis* NCIMB 13972^T**	**97.5**	**98.0**
***A. gonensis* NCIMB 13933^T**	**97.4**	**97.9**
A. thermarum DSM 17141^T	97.0	97.7
A. flavithermus DSM 2641^T	97.1	97.6
A. mongoliensis DSM 19169^T	96.9	97.4
A. flavithermus subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T	96.9	97.4
A. eryuanensis DSM 23212^T	96.5	97.0
A. kaynarcensis DSM 21706^T	96.5	97.0
A. suryakundensis DSM 27374^T	96.3	96.8
A. tengchongensis DSM 23211^T	96.3	96.8
A. pushchinoensis DSM 12423^T	96.2	96.7
A. kestanbolensis NCIMB 13971^T	95.9	96.5
A. bogrovensis DSM 17956^T	96.2	96.4
A. voinovskiensis DSM 17075^T	95.6	95.9
A. contaminans DSM 15866^T	95.2	95.7
A. calidus DSM 25220^T	95.3	95.6
A. vitaminiphilus JCM 16594^T	95.2	95.5
A. rupiensis DSM 17127^T	94.7	95.0
A. geothermalis ATCC BAA2555^T	94.6	94.9
A. amylolyticus DSM 15939^T	94.5	94.8
A. caldiproteolyticus DSM 15730^T	94.5	94.8
A. tepidamans DSM 16325^T	93.8	94.2



Şekil 5.2. E208a ve E184aa kodlu izolatlar ile en çok akrabalık gösterdikleri *Anoxybacillus* cinsine ait endospor oluşturan temsilci üyelerin 16S rRNA gen dizileri temel alınarak, Neighbour-joining metodu ile Mega 6 programı kullanılarak oluşturulmuş, evrimsel uzaklığı gösteren filogenetik ağaç. Bar her 100 nükleotid pozisyonundaki 0.005'lik yer değişikliğini işaret etmektedir. Dallanma noktalarında % 27 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir.

Filogenetik ağaçta, her iki izolatın en çok akrabalık gösterdikleri referans türlere yakın dallandıkları, ancak her ikisinin birlikte bir klad oluşturdukları net olarak görülmektedir. Ayrıca, izolatlarımızın en çok dizi benzerliği gösterdikleri *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*, *A. salavatliensis*, *A. kamchatkensis*, *A. ayderensis*, *A. gonensis* ve *A. thermarum* referanslarının da izolatlarımıza yakın, ancak farklı tek bir klad içerisinde dallandıkları görülmektedir.

16S rRNA gen dizi analizinden elde edilen verilerle gerçekleştirilen filogenetik analizler neticesinde; E184aa ve E208a izolatlarının, *Anoxybacillus* referans türlerine % 93.8-98.7

arasında gen dizi benzerlikleri gösterdikleri tespit edilmiştir. E184aa ve E208a izolatlarının, *Anoxybacillus* cinsine ait referans türler arasında en yüksek *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T'e sırasıyla % 98,1 ile % 98,7 ve en düşük *A. tepidamans* DSM 16325^T olmak üzere, sırasıyla % 93,8 ile % 94,2 oranlarında 16S rRNA gen dizi benzerlikleri gösterdikleri belirlenmiştir. E184aa ve E208a izolatları arasındaki gen dizi benzerliği ise % 99.4 olarak belirlenmiş ve 2 *Anoxybacillus* izolatının birbirine bu kadar yüksek oranda 16S rRNA gen dizi benzerliği göstermesi, hibridizasyon analizleri öncesinde her iki izolatın aynı türün iki farklı suşu olduğunu kanıtlar nitelikte olmuştur. Bu sonuçlar, E184aa ve E208a izolatlarının özellikle birbirleriyle ve bazı *Anoxybacillus* referans türleri ile DNA hibridizasyon analizlerinin yapılması gerektiğini göstermiştir.

Günümüzde taksonomik çalışmalarda, genellikle iki suş arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliğinin % 97.0 ve üzerinde olması durumunda, mutlaka DNA-DNA hibridizasyon analizlerinin yapılması önerilmektedir (4, 156, 158, 159). Bununla birlikte, bazı suşlar arasında % 99.0 oranında 16S rRNA gen dizi benzerliği bulunmasına karşın, hibridizasyon sonucunda % 70 ya da daha düşük bir hibridizasyon oranının elde edilebilmesi muhtemel olup, hibridizasyon sonucuna göre bu suşlar yeni tür olarak tanımlanabilmektedir (219). Ayrıca, 16S rRNA gen dizi benzerliği ile DNA-DNA hibridizasyon değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren mevcut verilerin yakın zamanda yeniden değerlendirilmesi sonucunda, yeni izolatların tanımlanması için 16S rRNA gen dizi benzerliğinin sadece ≥ % 98.2-99.0 olması durumunda, DNA-DNA hibridizasyon deneylerinin yapılması tavsiye edilmektedir (6, 172, 220). Literatürdeki bu bilgiler doğrultusunda; her iki izolatın da en az % 97.4 ve üzerinde 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdiği ve Çizelge 5.3'te koyu renkle belirtilmiş olan *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T, *A. salavatliensis* DSM 22626^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. ayderensis* NCIMB 13972^T ve *A. gonensis* NCIMB 13933^T referans türleri ile DNA-DNA hibridizasyon çaprazlamalarının yapılmasına karar verilmiştir. Ayrıca, E184aa ve E208a izolatları birbirlerine % 99.4 oranında 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdiklerinden kendi içlerinde de hibridizasyon analizlerinin gerçekleştirilmesi gerektiğine karar verilmiştir.

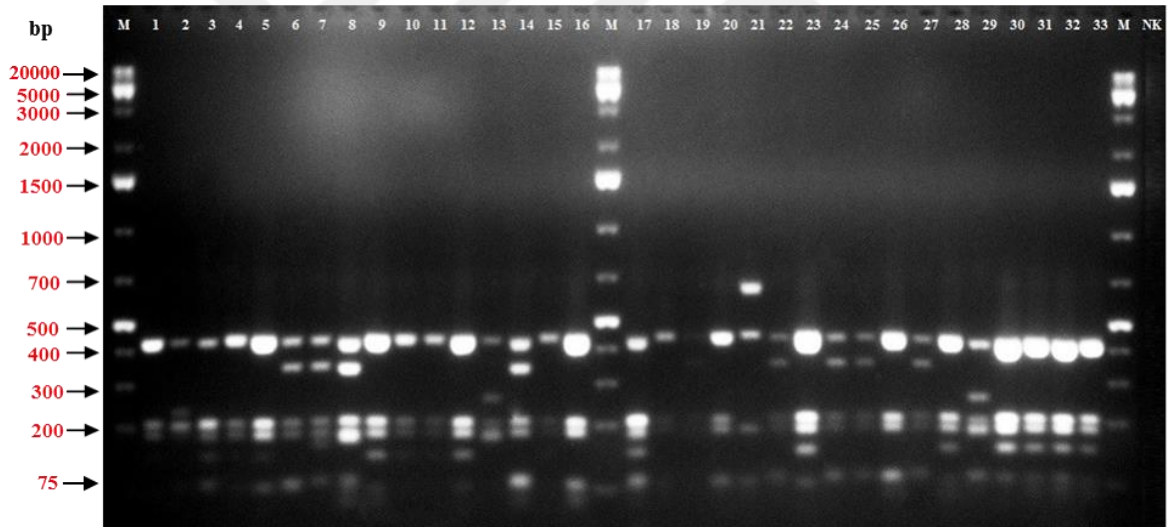
Ayrıca, bundan sonra yürütülen tüm fenotipik analizlere E184aa ve E208a izolatlarının % 97.0 ve üzerinde 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdiği saptanan *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T, *A. salavatliensis* DSM 22626^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. ayderensis* NCIMB 13972^T, *A. gonensis* NCIMB 13933^T, *A. thermarum* DSM 17141^T, *A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. mongoliensis* DSM 19169^T, *A. flavithermus*

subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T ve *A. kaynarcensis* DSM 21706^T referans türleri kıyaslama amacıyla dahil edilmiştir. Bunların yanı sıra, E184aa ve E208a izolatlarına % 97.0'nin altında 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren *A. suryakundensis* DSM 27374^T (sırasıyla % 96.3 ve 96.8) ve *A. kestanbolensis* NCIMB 13971^T (sırasıyla % 95.9 ve 96.5) referans türleri de bu çalışmalarda yer almıştır.

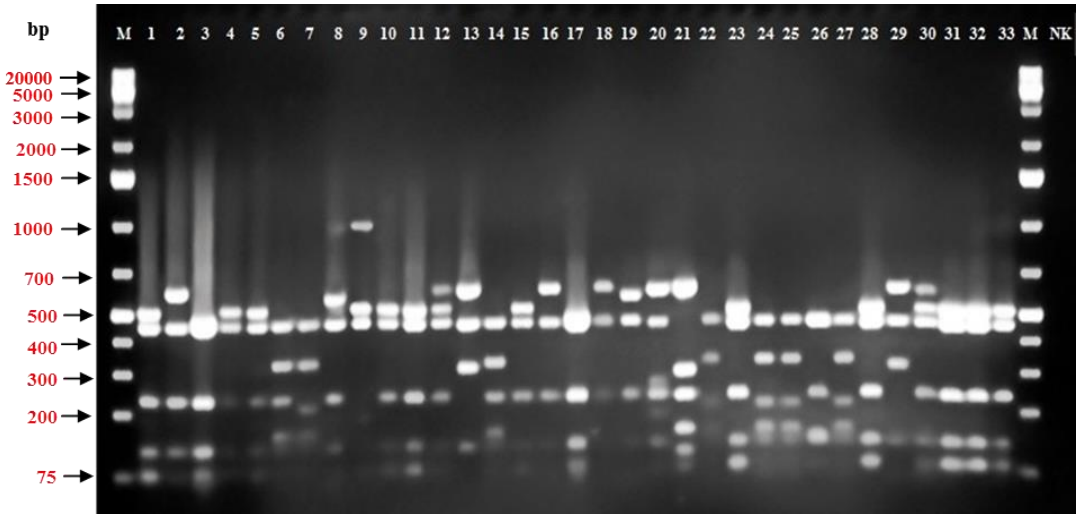
5.1.4. PCR TEMELLİ GENOMİK PARMAK İZİ TEKNİKLERİ VE FİLOGENETİK ANALİZLER

5.1.4.1. Çoğaltılmış Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA)

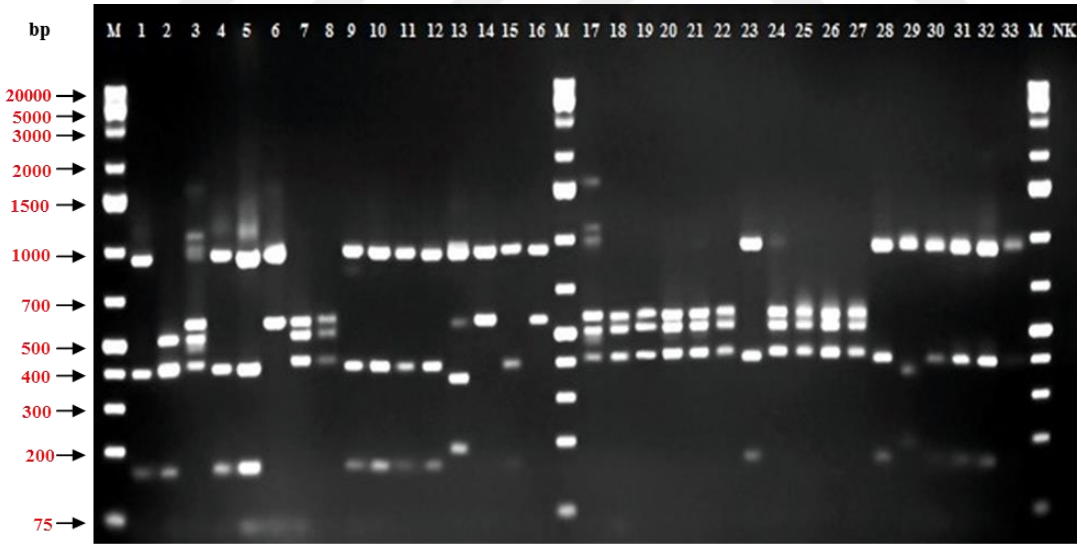
E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin çoğaltılmış 16S rRNA geni PCR ürünlerinin ***Alu*I**, ***Hae*III** ve ***Taq*I** restriksiyon enzimleri ile kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri sırasıyla Şekil 5.3, 5.4 ve 5.5'te sunulmaktadır.



Şekil 5.3. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürünlerinin *Alu*I restriksiyon enzimiyle kesimi sonrası elde edilen bantların jel elektroforez görüntüleri [1) *A. salavatliensis* (DSM 22626^T); 2) *A. calidus* (DSM 25220^T); 3) *Thermolongibacillus kozakliensis* (DSM 24978^T); 4) **E184aa**; 5) **E208a**; 6) *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus* (DSM 22629^T); 7) *G. stearothermophilus* (DSM 22^T); 8) *G. thermoglucosidans* (DSM 2542^T); 9) *A. gonensis* (NCIMB 13933^T); 10) *A. ayderensis* (NCIMB 13972^T); 11) *A. kestanbolensis* (NCIMB 13971^T); 12) *A. flavithermus* (DSM 2641^T); 13) *B. amyloliquefaciens* (DSM 7^T); 14) *Geobacillus thermodenitrificans* (DSM 465^T); 15) *A. kamchatkensis* (DSM 14988^T); 16) *A. amylolyticus* (DSM 15939^T); 17) *Thermolongibacillus altinsuensis* (DSM 24979^T); 18) *A. caldiproteolyticus* (DSM 15730^T); 19) *Geobacillus toebii* (DSM 14590^T); 20) *A. tepidamans* (DSM 16325^T); 21) *Aeribacillus pallidus* (DSM 3670^T); 22) *Geobacillus thermoleovorans* (DSM 5366^T); 23) *A. thermarum* (DSM 17141^T); 24) *Geobacillus kaustophilus* (DSM 7263^T); 25) *Geobacillus vulcani* (DSM 13174^T); 26) *A. rupiensis* (DSM 17127^T); 27) *A. voinovskiensis* (DSM 17075^T); 28) *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (DSM 18475^T); 29) *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* (KCTC 13759^T); 30) *A. flavithermus* subsp. *flavithermus* (DSM 2641^T); 31) *A. mongoliensis* (DSM 19169^T); 32) *A. suryakundensis* (DSM 27374^T); 33) *A. kaynarcensis* (DSM 21706^T); NK: Negatif kontrol; M: Marker (Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder; 75-20000 bç)]



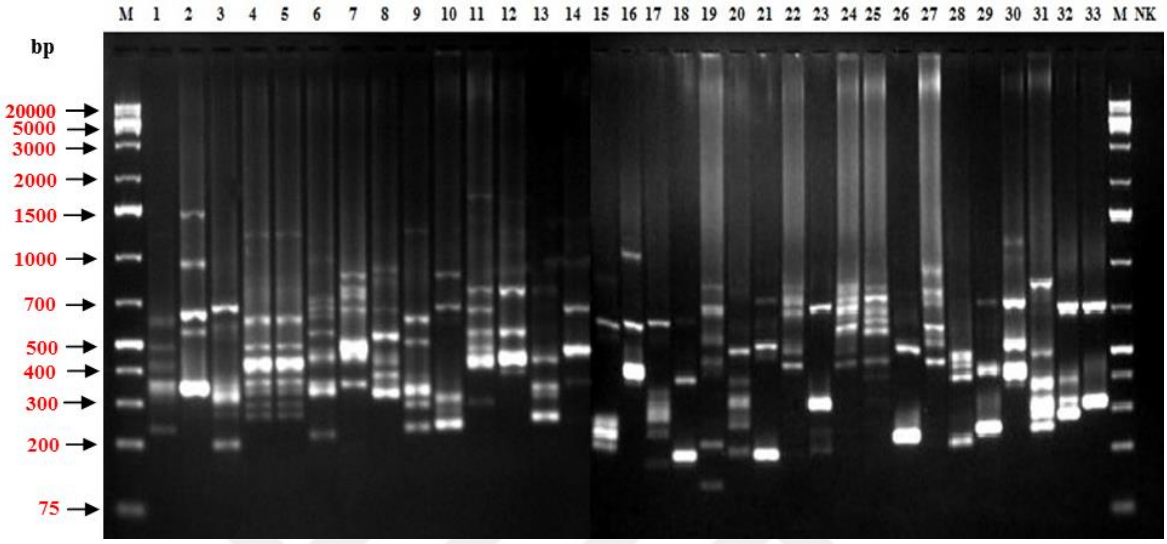
Şekil 5.4. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürünlerinin *Hae*III restriksiyon enzimiyle kesimi sonrası elde edilen bantların jel elektroforez görüntüleri [1) *A. salavatliensis* (DSM 22626^T); 2) *A. calidus* (DSM 25220^T); 3) *T. kozakliensis* (DSM 24978^T); 4) **E184aa**; 5) **E208a**; 6) *G. thermodenitrificans* subsp. *calidus* (DSM 22629^T); 7) *G. stearothermophilus* (DSM 22^T); 8) *G. thermoglucosidans* (DSM 2542^T); 9) *A. gonensis* (NCIMB 13933^T); 10) *A. ayderensis* (NCIMB 13972^T); 11) *A. kestanbolensis* (NCIMB 13971^T); 12) *A. flavithermus* (DSM 2641^T); 13) *B. amyloliquefaciens* (DSM 7^T); 14) *G. thermodenitrificans* (DSM 465^T); 15) *A. kamchatkensis* (DSM 14988^T); 16) *A. amylolyticus* (DSM 15939^T); 17) *T. altinsuensis* (DSM 24979^T); 18) *A. caldiproteolyticus* (DSM 15730^T); 19) *G. toebii* (DSM 14590^T); 20) *A. tepidamans* (DSM 16325^T); 21) *A. pallidus* (DSM 3670^T); 22) *G. thermoleovorans* (DSM 5366^T); 23) *A. thermarum* (DSM 17141^T); 24) *G. kaustophilus* (DSM 7263^T); 25) *G. vulcani* (DSM 13174^T); 26) *A. rupiensis* (DSM 17127^T); 27) *A. voinovskiensis* (DSM 17075^T); 28) *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (DSM 18475^T); 29) *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* (KCTC 13759^T); 30) *A. flavithermus* subsp. *flavithermus* (DSM 2641^T); 31) *A. mongoliensis* (DSM 19169^T); 32) *A. suryakundensis* (DSM 27374^T); 33) *A. kaynarcensis* (DSM 21706^T); NK: Negatif kontrol; M: Marker (Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder; 75-20000 bç)]



Şekil 5.5. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin çoğaltılmış 16S rRNA PCR ürünlerinin *Taq*I restriksiyon enzimiyle kesimi sonrası elde edilen bantların jel elektroforez görüntüleri [1) *A. salavatliensis* (DSM 22626^T); 2) *A. calidus* (DSM 25220^T); 3) *T. kozakliensis* (DSM 24978^T); 4) **E184aa**; 5) **E208a**; 6) *G. thermodenitrificans* subsp. *calidus* (DSM 22629^T); 7) *G. stearothermophilus* (DSM 22^T); 8) *G. thermoglucosidans* (DSM 2542^T); 9) *A. gonensis* (NCIMB 13933^T); 10) *A ayderensis* (NCIMB 13972^T); 11) *A. kestanbolensis* (NCIMB 13971^T); 12) *A. flavithermus* (DSM 2641^T); 13) *B. amyloliquefaciens* (DSM 7^T); 14) *G. thermodenitrificans* (DSM 465^T); 15) *A. kamchatkensis* (DSM 14988^T); 16) *A. amylolyticus* (DSM 15939^T); 17) *T. altinsuensis* (DSM 24979^T); 18) *A. caldiproteolyticus* (DSM 15730^T); 19) *G. toebii* (DSM 14590^T); 20) *A. tepidamans* (DSM 16325^T); 21) *A. pallidus* (DSM 3670^T); 22) *G. thermoleovorans* (DSM 5366^T); 23) *A. thermarum* (DSM 17141^T); 24) *G. kaustophilus* (DSM 7263^T); 25) *G. vulcani* (DSM 13174^T); 26) *A. rupiensis* (DSM 17127^T); 27) *A. voinovskiensis* (DSM 17075^T); 28) *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (DSM 18475^T); 29) *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* (KCTC 13759^T); 30) *A. flavithermus* subsp. *flavithermus* (DSM 2641^T); 31) *A. mongoliensis* (DSM 19169^T); 32) *A. suryakundensis* (DSM 27374^T); 33) *A. kaynarcensis* (DSM 21706^T); NK: Negatif kontrol; M: Marker (Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder; 75-20000 bç)]

5.1.4.2. İntergenik 16S-23S rRNA Gen Dizilerinin PCR Reaksiyonu (ITS-PCR)

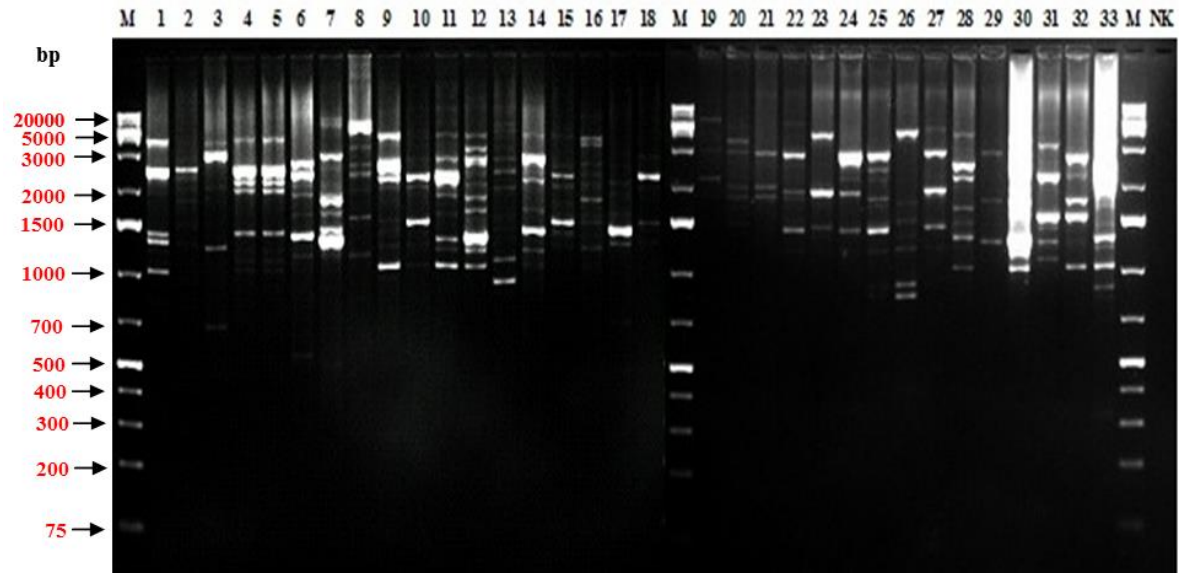
E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin S-D-Bact-1494-a-S-20 ve L-D-Bact-0035-a-A-15 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen ITS-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezdeki bant profilleri Şekil 5.6'da sunulmaktadır.



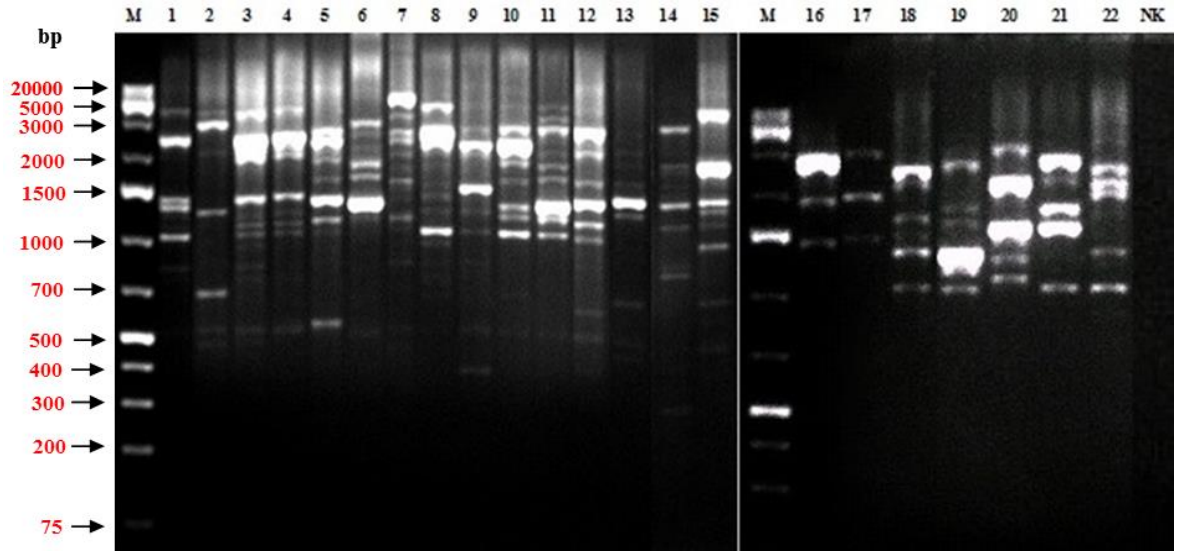
Şekil 5.6. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin S-D-Bact-1494-a-S-20 ve L-D-Bact-0035-a-A-15 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen ITS-PCR ürünlerinin jel elektroforezdeki bant profilleri [1) *A. salavatliensis* (DSM 22626^T); 2) *A. calidus* (DSM 25220^T); 3) *T. kozakliensis* (DSM 24978^T); 4) **E184aa**; 5) **E208a**; 6) *G. thermodenitrificans* subsp. *calidus* (DSM 22629^T); 7) *G. stearothermophilus* (DSM 22^T); 8) *G. thermoglucosidans* (DSM 2542^T); 9) *A. gonensis* (NCIMB 13933^T); 10) *A. ayderensis* (NCIMB 13972^T); 11) *A. kestanbolensis* (NCIMB 13971^T); 12) *A. flavithermus* (DSM 2641^T); 13) *B. amyloliquefaciens* (DSM 7^T); 14) *G. thermodenitrificans* (DSM 465^T); 15) *A. kamchatkensis* (DSM 14988^T); 16) *A. amylolyticus* (DSM 15939^T); 17) *T. altinsuensis* (DSM 24979^T); 18) *A. caldiproteolyticus* (DSM 15730^T); 19) *G. toebii* (DSM 14590^T); 20) *A. tepidamans* (DSM 16325^T); 21) *A. pallidus* (DSM 3670^T); 22) *G. thermoleovorans* (DSM 5366^T); 23) *A. thermarum* (DSM 17141^T); 24) *G. kaustophilus* (DSM 7263^T); 25) *G. vulcani* (DSM 13174^T); 26) *A. rupiensis* (DSM 17127^T); 27) *A. voinovskiensis* (DSM 17075^T); 28) *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (DSM 18475^T); 29) *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* (KCTC 13759^T); 30) *A. flavithermus* subsp. *flavithermus* (DSM 2641^T); 31) *A. mongoliensis* (DSM 19169^T); 32) *A. suryakundensis* (DSM 27374^T); 33) *A. kaynarcensis* (DSM 21706^T); NK: Negatif kontrol; M: Marker (Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder; 75-20000 bç)]

5.1.4.3. Tekrarlı Palindromik $(GTG)_5$ ve BOX Dizilerinin PCR ile Çoğaltılması (*Rep*-PCR)

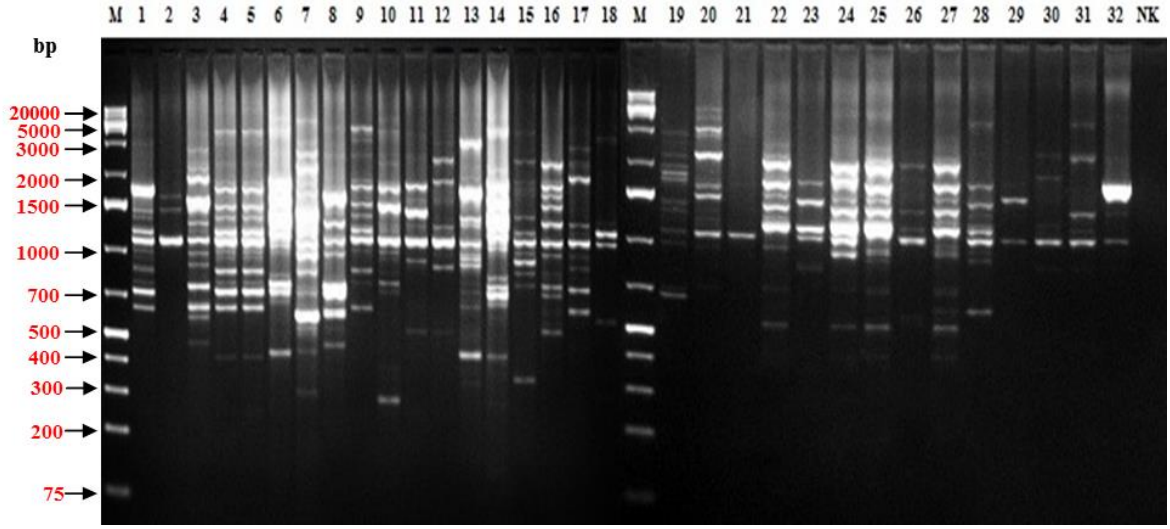
E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin $(GTG)_5$ primeri gerçekleştirilen $(GTG)_5$-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezdeki bant profilleri Şekil 5.7 ve 5.8'de, BOXA1 primeri kullanılarak gerçekleştirilen BOX-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezdeki bant profilleri ise Şekil 5.9 ve 5.10'da sunulmaktadır.



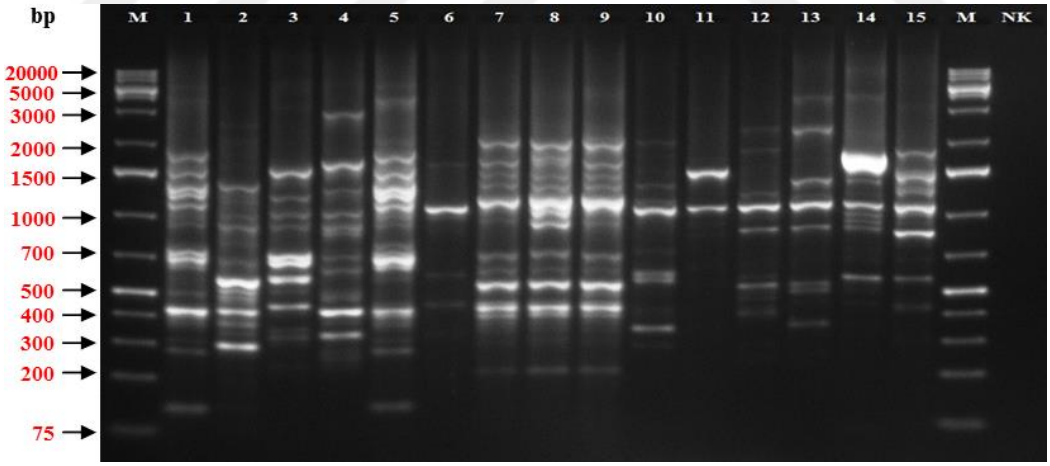
Şekil 5.7. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin $(GTG)_5$ primeri kullanılarak gerçekleştirilen $(GTG)_5$-PCR ürünlerinin jel elektroforezdeki bant profilleri [1) *A. salavatliensis* (DSM 22626^T); 2) *A. calidus* (DSM 25220^T); 3) *T. kozakliensis* (DSM 24978^T); 4) **E184aa**; 5) **E208a**; 6) *G. thermodenitrificans* subsp. *calidus* (DSM 22629^T); 7) *G. stearothermophilus* (DSM 22^T); 8) *G. thermoglucosidans* (DSM 2542^T); 9) *A. gonensis* (NCIMB 13933^T); 10) *A. ayderensis* (NCIMB 13972^T); 11) *A. kestanbolensis* (NCIMB 13971^T); 12) *A. flavithermus* (DSM 2641^T); 13) *B. amyloliquefaciens* (DSM 7^T); 14) *G. thermodenitrificans* (DSM 465^T); 15) *A. kamchatkensis* (DSM 14988^T); 16) *A. amylolyticus* (DSM 15939^T); 17) *T. altinsuensis* (DSM 24979^T); 18) *A. caldiproteolyticus* (DSM 15730^T); 19) *G. toebii* (DSM 14590^T); 20) *A. tepidamans* (DSM 16325^T); 21) *A. pallidus* (DSM 3670^T); 22) *G. thermoleovorans* (DSM 5366^T); 23) *A. thermarum* (DSM 17141^T); 24) *G. kaustophilus* (DSM 7263^T); 25) *G. vulcani* (DSM 13174^T); 26) *A. rupiensis* (DSM 17127^T); 27) *A. voinovskiensis* (DSM 17075^T); 28) *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (DSM 18475^T); 29) *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* (KCTC 13759^T); 30) *A. flavithermus* subsp. *flavithermus* (DSM 2641^T); 31) *A. mongoliensis* (DSM 19169^T); 32) *A. suryakundensis* (DSM 27374^T); 33) *A. kaynarcensis* (DSM 21706^T); NK: Negatif kontrol; M: Marker (Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder; 75-20000 bç)]



Şekil 5.8. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin tekrarlanan $(GTG)_5$-PCR ürünlerinin jel elektroforezdeki bant profilleri [1) *A. salavatliensis* (DSM 22626^T); 2) *T. kozakliensis* (DSM 24978^T); 3) **E184aa**; 4) **E208a**; 5) *G. thermodenitrificans* subsp. *calidus* (DSM 22629^T); 6) *G. stearothermophilus* (DSM 22^T); 7) *G. thermoglucosidans* (DSM 2542^T); 8) *A. gonensis* (NCIMB 13933^T); 9) *A. ayderensis* (NCIMB 13972^T); 10) *A. kestanbolensis* (NCIMB 13971^T); 11) *A. flavithermus* (DSM 2641^T); 12) *G. thermodenitrificans* (DSM 465^T); 13) *T. altinsuensis* (DSM 24979^T); 14) *G. thermoleovorans* (DSM 5366^T); 15) *A. thermarum* (DSM 17141^T); 16) *G. kaustophilus* (DSM 7263^T); 17) *A. voinovskiensis* (DSM 17075^T); 18) *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (DSM 18475^T); 19) *A. flavithermus* subsp. *flavithermus* (DSM 2641^T); 20) *A. mongoliensis* (DSM 19169^T); 21) *A. suryakundensis* (DSM 27374^T); 22) *A. kaynarcensis* (DSM 21706^T); NK: Negatif kontrol; M: Marker (Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder; 75-20000 bç)]



Şekil 5.9. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin BOXA1R primeri kullanılarak gerçekleştirilen BOX-PCR ürünlerinin jel elektroforezdeki bant profilleri [1) *A. salavatliensis* (DSM 22626^T); 2) *A. calidus* (DSM 25220^T); 3) *T. kozakliensis* (DSM 24978^T); 4) **E184aa**; 5) **E208a**; 6) *G. thermodenitrificans* subsp. *calidus* (DSM 22629^T); 7) *G. stearothermophilus* (DSM 22^T); 8) *G. thermoglucosidans* (DSM 2542^T); 9) *A. gonensis* (NCIMB 13933^T); 10) *A. ayderensis* (NCIMB 13972^T); 11) *A. kestanbolensis* (NCIMB 13971^T); 12) *A. flavithermus* (DSM 2641^T); 13) *B. amyloliquefaciens* (DSM 7^T); 14) *G. thermodenitrificans* (DSM 465^T); 15) *A. kamchatkensis* (DSM 14988^T) ; 16) *A. amylolyticus* (DSM 15939^T); 17) *T. altinsuensis* (DSM 24979^T); 18) *A. caldiproteolyticus* (DSM 15730^T);19) *G. toebii* (DSM 14590^T); 20) *A. tepidamans* (DSM 16325^T); 21) *A. pallidus* (DSM 3670^T); 22) *G. thermoleovorans* (DSM 5366^T); 23) *A. thermarum* (DSM 17141^T); 24) *G. kaustophilus* (DSM 7263^T); 25) *G. vulcani* (DSM 13174^T); 26) *A. rupiensis* (DSM 17127^T); 27) *A. voinovskiensis* (DSM 17075^T); 28) *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (DSM 18475^T); 29) *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* (KCTC 13759^T); 30) *A. flavithermus* subsp. *flavithermus* (DSM 2641^T); 31) *A. mongoliensis* (DSM 19169^T); 32) *A. suryakundensis* (DSM 27374^T); NK: Negatif kontrol; M: Marker (Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder; 75-20000 bç)]

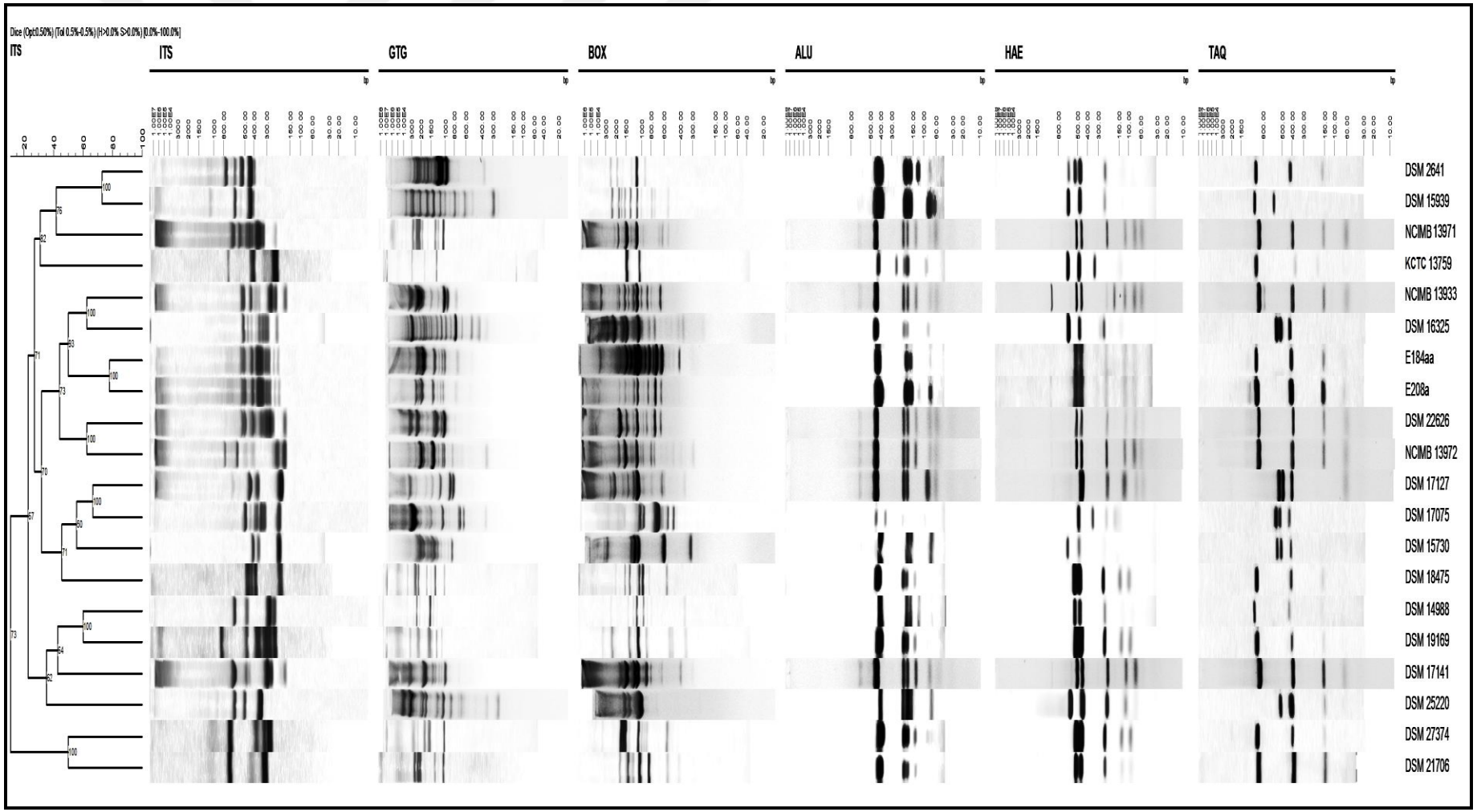


Şekil 5.10. *Anoxybacillus* referans türlerinin tekrarlanan BOX-PCR ürünlerinin jel elektroforezdeki bant profilleri [1) *G. thermodenitrificans* subsp. *calidus* (DSM 22629^T); 2) *G. stearothermophilus* (DSM 22^T); 3) *G. thermoglucosidans* (DSM 2542^T); 4) *B. amyloliquefaciens* (DSM 7^T); 5) *G. thermodenitrificans* (DSM 465^T); 6) *A. pallidus* (DSM 3670^T); 7) *G. thermoleovorans* (DSM 5366^T); 8) *G. kaustophilus* (DSM 7263^T); 9) *G. vulcani* (DSM 13174^T); 10) *A. rupiensis* (DSM 17127^T); 11) *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* (KCTC 13759^T); 12) *A. flavithermus* subsp. *flavithermus* (DSM 2641^T); 13) *A. mongoliensis* (DSM 19169^T); 14) *A. suryakundensis* (DSM 27374^T); 15) *A. kaynarcensis* (DSM 21706^T); NK: Negatif kontrol; M: Marker (Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder; 75-20000 bç)]

5.1.4.4. ARDRA, ITS-PCR, BOXA1-PCR ve $(GTG)_5$-PCR Reaksiyonları Sonucu Elde Edilen Moleküler Verilerin Filogenetik Analizleri

16S rRNA-ARDRA (*Alu*I, *Hae*III ve *Taq*I restriksiyon enzim kesimleri) ve tüm genomun tarandığı ITS-PCR, BOXA1-PCR ve $(GTG)_5$-PCR DNA parmak izi profilleri, GelCompar II yazılım programı kullanılarak gerçekleştirilen kümülatif kümeleme analizleri sonucunda, Şekil 5.11'de sunulduğu üzere tek bir dendrogramda toplanmıştır. ***Alu*I restriksiyon enzim kesimi** ile oluşan bant desenleri incelendiğinde; E184aa ve E208a izolatlarının filogenetik olarak *A. flavithermus* DSM 2641^T referans türü ile benzer, ancak diğer referans türlerden farklı bir bant profili sergiledikleri görülmektedir. ***Hae*III kesim profillerine** göre, E184aa ve E208a izolatları sadece birbirleri ile benzer profil sergilemişler ve filogenetik ağaçta tek bir dalda kümelenmişlerdir. Ayrıca, ağaçtaki hiçbir referans türle bant profili açısından benzerlik göstermemişlerdir. Bunun yanı sıra, yüksek oranda 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdikleri *A. salavatliensis* DSM 22626^T suşu ile bant farklılıkları içermelerine rağmen, yakın dallanma yapmış olmaları dikkat çekmiştir. ***Taq*I kesim profillerine** göre ise, E184aa ve E208a izolatları sadece birbirleriyle örtüşen eşsiz bir kesim deseni oluşturmuşlar ve birarada kümelenmişlerdir. Ayrıca, 16S rRNA geni yönünden onlara en yakın türlerin *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T ve *A. flavithermus* DSM 2641^T oldukları görülmektedir.

ITS-PCR ve $(GTG)_5$-PCR reaksiyonları sonucu elde edilen bant profillerinin filogenetik analizleri, E184aa ve E208a izolatlarının sadece birbirlerine benzerlik gösterdikleri eşsiz bant desenleri ve filogenetik ağaçta oluşturdukları bireysel kümelenmeyle, tüm *Anoxybacillus* referans suşlarından farklı bir filogenetik grupta olduklarını göstermiştir. İzolatların % 97.0 ve üzerinde 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdikleri, özellikle *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T, *A. salavatliensis* DSM 22626^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. ayderensis* NCIMB 13972^T ve *A. gonensis* NCIMB 13933^T referans türlerinden bant profili ve filogenetik pozisyon yönünden farklı oldukları gözlenmiştir. BOXA1-PCR profilleri yönünden ise, izolatların filogenetik olarak en fazla *A. salavatliensis* DSM 22626^T'e benzerlik gösterdikleri ve kendi aralarında ise farklı bant profilleri sergiledikleri görülmüştür.



Şekil 5.11. *Anoxybacillus* cinsine dahil E184aa ve E208a kodlu izolatlar ve referans suşların *Alu*I, *Hae*III ve *Taq*I ARDRA bant profilleri ile ITS-PCR, BOXA1 ve $(GTG)_5$-PCR DNA parmak izi profillerinin topluca ele alındığı filogenetik ağaç (DSM 2641: *A. flavithermus*; DSM 15939: *A. amylolyticus*; NCIMB 13971: *A. kestanbolensis*; KCTC 13759: *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis*; NCIMB 13933: *A. gonensis*; DSM 16325: *A. tepidamans*; DSM 22626: *A. salavatliensis*; NCIMB 13972: *A. ayderensis*; DSM 17127: *A. rupiensis*; DSM 17075: *A. voinovskiensis*; DSM 15730: *A. caldiproteolyticus*; DSM 18475: *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*; DSM 14988: *A. kamchatkensis*; DSM 19169: *A. mongoliensis*; DSM 17141: *A. thermarum*; DSM 25220: *A. calidus*; DSM 27374: *A. suryakundensis*; DSM 21706: *A. kaynarcensis*)

Bu kümülatif sonuçlara göre oluşturulan filogenetik dendrogramda, çalışmaya dahil edilen E184aa ve E208a izolatlarının, 16S rRNA gen dizi analizlerinde en çok benzerlik gösterdikleri referans türlerden, özellikle *HaeIII*-ARDRA, ITS-PCR ve $(GTG)_5$-PCR profilleri yönünden eşsiz bant profilleri sergiledikleri ve filogenetik ağaçta diğer tüm referans türlerden farklı bir dal oluşturdukları görülmektedir. Birbirlerine % 99.4 oranında yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren izolatlar, gerçekleştirilen tüm DNA parmak izi analizlerinde benzer bant profili sergilemişlerdir. Ayrıca, her iki izolat da BOXA1-PCR profili yönünden birbirlerinden farklı bir moleküler profil sergileyerek ayırt edilebilmektedir. Tanımlanmış diğer referans türlerin de özellikle ITS-PCR, $(GTG)_5$-PCR ve BOX-PCR reaksiyonlarındaki eşsiz bant profilleriyle birbirlerinden ayırt edilebildikleri görülmektedir.

5.2. KLASİK FENOTİPİK ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK GERÇEKLEŞTİRİLEN TÜM ANALİZLERİN SONUÇLARI

Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin belirlendiği tüm fenotipik karakterizasyon testleri, E184aa ve E208a kodlu izolatlar ile bu izolatlara en çok 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren 12 referans suş kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

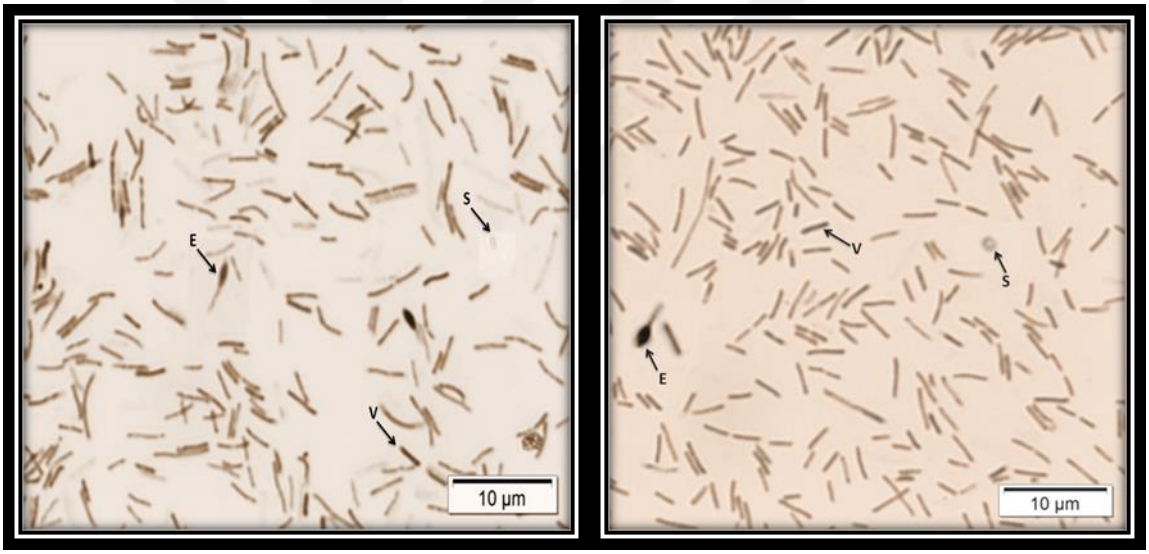
5.2.1. HÜCRE VE KOLONİ MORFOLOJİLERİ, HAREKET YETENEKLERİ VE SPOR YAPILARI

Tür teşhisi yapılan E184aa ve E208a kodlu izolatların Gram boyamaları, hücre ve koloni morfolojileri, spor ve flagella yapıları incelenmiştir. Her iki izolat da Gram pozitif, hareketli ve spor oluşturabilen çubuk şeklinde hücreler içermektedir. İzolatlar, *Bacillaceae* familyasının karakteristik özelliklerine sahip olduklarından; sporlu, termofilik basil türleri olarak tanımlanmışlardır. E184aa ve E208a izolatlarının ve filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerin hücre ve koloni morfolojileri, hareket yetenekleri ve spor yapılarına dair detaylı bilgiler Çizelge 5.4'te verilmiştir.

Çizelge 5.4. İzolatlar ve filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerin hücre ve koloni morfolojileri, hareket yetenekleri ve spor yapıları (TE: test edilmedi)

Sıra	Bakteri Kodu	Türü	Hücre Morfolojisi			Hareket Yeteneği		Koloni Morfolojisi							Spor Yapısı		
			Gram boyama	Kok/basil	Ort. hücre boyutu (en, boy) (µm)	Hareket	Flagella tipi	Tüm koloni	Kenar yapısı	Dikey görünüm	Yüzey	Mukoidlik	Koloni rengi	Transparan /Opak	Spor pozisyonu	Spor Şekli	Şişkin spor
1	E184aa	*Anoxybacillus* sp.	+	Basil	0,22-0,66; 1,19-6,46	+	Peritriş	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	-	Açık sarı	Opak	Subterminal-terminal	Oval	-
2	E208a	*Anoxybacillus* sp.	+	Basil	0,29-0,73; 1,28-7,14	+	Monotriş	Yuvarlak	Düz	Kabarık göbekli	Düz	-	Açık sarı	Opak	Subterminal-terminal	Oval	+
3	DSM 22626^{T}	*A.salavatliensis*	+	Basil	TE	+	TE	Yuvarlak	Düz	Kabarık göbekli	Düz	-	Sarı	Opak	Terminal	Oval	-
4	NCIMB 13933^{T}	*A. gonensis*	+	Basil	TE	+	TE	Yuvarlak	Düz	Basık göbekli	Düz	-	Krem	Opak	Terminal	Oval	+
5	NCIMB 13972^{T}	*A. ayderensis*	+	Basil	TE	+	TE	Yuvarlak	Düz	Kabarık göbekli	Düz	-	Krem	Opak	Subterminal-terminal	Oval	-
6	NCIMB 13971^{T}	*A. kestanbolensis*	+	Basil	TE	+	TE	Yuvarlak	Düz	Kabarık göbekli	Düz	-	Krem mat	Opak	Subterminal	Oval	-
7	DSM 2641^{T}	*A. flavithermus*	+	Basil	TE	+	TE	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	-	Sarı mat	Opak	Subterminal-terminal	Oval	-
8	DSM 14988^{T}	*A. kamchatkensis*	+	Basil	TE	+	Peritriş	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	-	Koyu sarı mat	Trans	Terminal	Oval	-
9	DSM 17141^{T}	*A. thermarum*	+	Basil	TE	+	TE	Yuvarlak	Düz	Kabarık göbekli	Düz	-	Krem mat	Opak	Terminal	Oval	+
10	DSM 18475^{T}	*A.kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*	+	Basil	TE	+	TE	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	-	Krem	Trans	Terminal	Oval	+
11	KCTC 13759^{T}	*A. flavithermus* subsp. *yunnanensis*	+	Basil	TE	+	TE	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	-	Krem mat	Opak	Terminal	Oval	-
12	DSM 19169^{T}	*A. mongoliensis*	+	Basil	TE	+	TE	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	-	Krem	Opak	Terminal	Oval	+
13	DSM 27374^{T}	*A. suryakundensis*	+	Basil	TE	+	TE	Yuvarlak	Düz	Kabarık	Düz	-	Krem mat	Opak	Terminal	Oval	-
14	DSM 21706^{T}	*A. kaynarcensis*	+	Basil	TE	+	TE	Yuvarlak	Düz	Kabarık göbekli	Düz	-	Krem	Trans	Subterminal	Oval	+

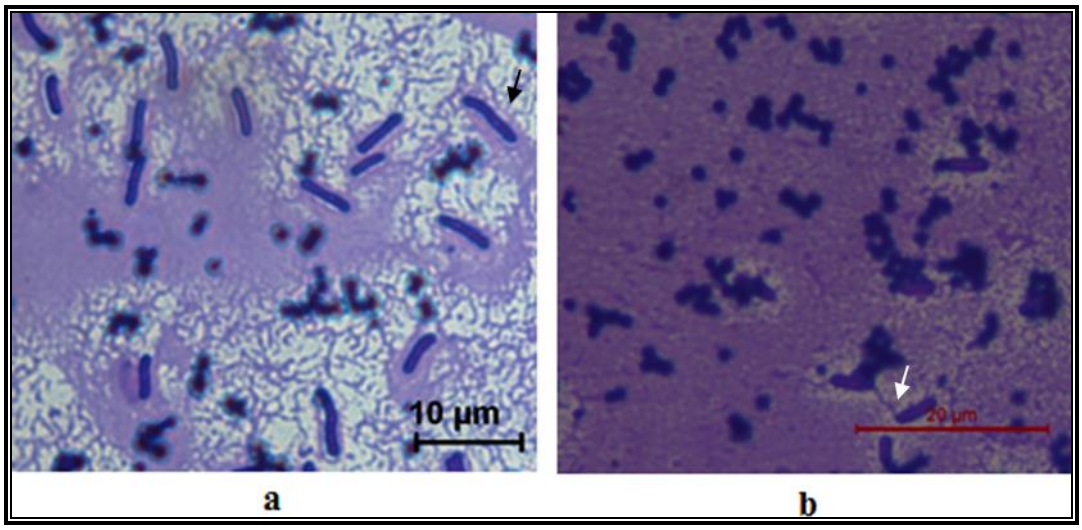
İzolatların spor oluşumu, 55°C'de 6-48 saatlik MI katı besiyerinde üretilmiş kültürler kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan faz kontrast mikroskobisi incelemelerinde, 6 saat sonunda her iki izolatın da spor üretmeyen genç vejetatif hücreler şeklinde oldukları, 18 saat sonunda yaklaşık % 1-2'sinin, 24 saat sonunda yaklaşık % 5'inin ve 48 saat sonunda ise neredeyse tamamının spor oluşturan hücrelerden oluştukları gözlemlenmiştir. Spor oluşturan izolatlar spor şekli, vejetatif hücredeki spor pozisyonu ve şişkinlik oluşturup oluşturmaması açısından da incelenmiştir. Yine faz kontrast mikroskobisi incelemelerinde, her iki izolatın da hücre içerisinde subterminal-terminal pozisyonda yer alan endosporlara ve oval şekilli sporlara sahip oldukları görülmüştür. E184aa izolatının şişkin olmayan, E208a izolatının ise şişkin bir sporangiyum yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir. E184aa ve E208 izolatlarının ortalama hücre boyutları (en/boy) sırasıyla 0,22-0,66/1,19-6,46 µm ve 0,29-0,73/1,28-7,14 µm aralıklarında ölçülmüştür. İzolatların hücre morfolojilerini gösteren ışık mikroskobisi görüntüleri Şekil 5.12'de sunulmuştur.



a **b**

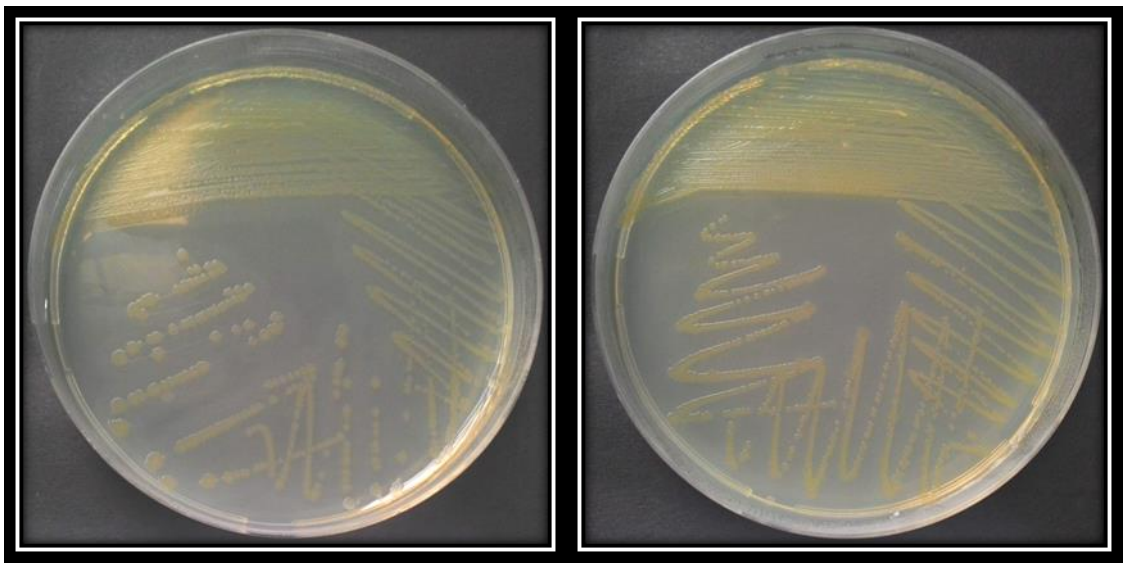
Şekil 5.12. **a.** E184aa ve **b.** E208a izolatlarının MI sıvı besiyerinde 55°C'de 18 saat üretilen kültürlerine ait ışık mikroskobu görüntüleri (V; vejetatif hücre, E; endospor, S; spor)

İzolatların flagella varlıklarının ve tiplerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen flagella boyaması sonrası ışık mikroskobu ile yapılan incelemelerde, E184aa izolatının peritriş, E208a izolatının ise monotriş flagella tipine sahip olduğu görülmüştür. İzolatların flagella tiplerini gösteren mikrograflar Şekil 5.13'te görülmektedir.



Şekil 5.13. **a.** E184aa izolatına ait peritriş flagella yapısı ve **b.** E208a izolatına ait monotriş flagella yapısının ışık mikroskobu görüntüleri

İzolatların koloni morfolojileri incelendiğinde, kolonilerinin yuvarlak, düz kenarlı, opak, düz yüzeyli ve referans türlerden farklı olarak açık sarı renkte oldukları gözlemlenmiştir. Ayrıca, E184aa izolatına ait kolonilerin dikey görünümü kabarık iken E208a izolatının kabarık göbekli olduğu görülmüştür. Her iki izolatın da koloni morfolojilerinin incelendiği MI besiyerinde 55°C'de 18 saat üretilen saf kültürlerine ait petri görüntüleri Şekil 5.14'te sunulmuştur.



a b

Şekil 5.14. **a.** E184aa ve **b.** E208a izolatlarının MI besiyerinde 55°C'de 18 saat üretilen saf kültürlerine ait petri görüntüleri

5.2.2. FARKLI pH, SICAKLIK VE TUZ KONSANTRASYONLARINDAKİ ÜREMELERİ VE BAZI BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI

İzolatların ve filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerin farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarındaki üremeleri, kalitatif amilaz, katalaz ve oksidaz aktivitesi ile kazein hidrolizi test sonuçları Çizelge 5.5'te sunulmuştur. Buna göre; E184aa izolatının, pH 7.0-11.0 aralığında ve pH 7.5'da optimum üreme gösterdiği, E208a izolatının ise pH 5.5-11.0 gibi daha geniş bir pH aralığında ve pH 7.0'de optimum üreme gösterdiği belirlenmiştir. E184aa ve E208a izolatlarının, sırasıyla 37-65°C ve 37-70°C olmak üzere geniş sıcaklık aralıklarında üreyebildikleri belirlenmiş ve her iki izolat da filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerlerden *A. thermarum* DSM17141^T (55-67°C) türü dışında diğer türlere benzer şekilde fakültatif termofilik üreme özelliği göstermişlerdir. Her iki izolatın da optimum üreme sıcaklığı 55°C'dir. E184aa izolatı % 0-2.5 aralığındaki tuz konsantrasyonlarını tolere ederken, E208a izolatı referans türlerden *A. mongoliensis* DSM 19169^T dışındaki diğer türlerden farklı olarak % 0-5.0 gibi daha geniş bir tuz konsantrasyonunda üreyerek halotolerant olarak gruplandırılmıştır. E184aa ve E208a izolatları, sırasıyla % 1.0-1.5 ve % 0.5-1.0 aralığındaki tuz konsantrasyonlarında optimum üreme göstermişlerdir.

İzolatlar birbirlerinden ve referans türlerden kalitatif katalaz, amilaz, oksidaz ve kazein hidroliz testleri yönünden de farklılık içermektedirler. E184aa izolatının, *A. kaynarcensis* DSM 21706^T dışında, diğer referans türlerden farklı olarak zayıf pozitif katalaz aktivitesi gösterdiği; E208a izolatının ise *A. kaynarcensis* DSM 21706^T *ve A. kamchatkensi*s DSM 14988^T dışında kalan diğer türlere benzer şekilde pozitif katalaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Her iki izolat da zayıf pozitif amilaz aktivitesi gösteren *A. kamchatkensi*s DSM 14988^T, *A. thermarum* DSM 17141^T ve *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T türlerinden farklı olarak yüksek amilolitik aktivite göstermişlerdir. E184aa izolatının, *A. kamchatkensi*s DSM 14988^T, *A. thermarum* DSM 17141^T, *A. kaynarcensis* DSM 21706^T ve *A. kamchatkensi*s subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T dışındaki diğer referanslardan farklı olarak oksidaz aktivitesi göstermediği, E208a izolatının ise tüm referans türlerden farklı olarak zayıf pozitif oksidaz reaksiyonu gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, her iki izolat da *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T, *A. mongoliensis* DSM 19169^T ve *A. suryakundensis* DSM 27374^T türlerinden farklı olarak negatif kazein hidroliz reaksiyonu göstermiştir.

Çizelge 5.5. İzolatların ve filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerin farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarındaki üremeleri ve bazı biyokimyasal test sonuçları (⊥: zayıf pozitif)

Sıra	Bakteri Kodu	Türü	pH isteği		Sıcaklık (°C) isteği		Tuz (NaCl) toleransı		Kalitatif katalaz aktivitesi	Kalitatif amilaz aktivitesi	Oksidaz testi	Kazein hidroliz testi
			pH aralığı	Optimum pH	Sıcaklık aralığı (°C)	Optimum sıcaklık (°C)	Tuz aralığı (%)	Optimum tuz (%)				
1	E184aa	*Anoxybacillus* sp.	7.0-11.0	7.5	37-65	55	0-2.5	1.0-1.5	⊥	+	-	-
2	E208a	*Anoxybacillus* sp.	5.5-11.0	7.0	37-70	55	0-5.0	0.5-1.0	+	+	⊥	-
3	DSM 22626^{T}	*A.salavatliensis*	5.5-9.5	8.0-9.0	37-69	60	0-4.5	2.0	+	+	+	-
4	NCIMB 13933^{T}	*A. gonensis*	5.5-10.5	7.5-8.0	40-70	55-60	1.5-3.0	2.0	+	+	+	-
5	NCIMB 13972^{T}	*A. ayderensis*	5.5-11.0	7.5-8.5	30-70	50	0-3.0	1.5	+	+	+	-
6	NCIMB 13971^{T}	*A. kestanbolensis*	6.0-10.5	7.5-8.5	40-70	50-55	0.5-3.5	2.5	+	+	+	-
7	DSM 2641^{T}	*A. flavithermus*	5.5-9.0	7.0	30-72	60-65	0-2.5	0.5	+	+	+	-
8	DSM 14988^{T}	*A. kamchatkensis*	5.7-9.9	8.0-8.5	38-67	60	0-2.5	1.0	-	⊥	-	-
9	DSM 17141^{T}	*A. thermarum*	6.0-8.0	7.0	55-67	65	0-3.0	0.5	+	⊥	-	-
10	DSM 18475^{T}	*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*	5.5-9.5	7.5	35-65	55	0-3.0	1.5	+	+	-	-
11	KCTC 13759^{T}	*A. flavithermus* subsp. *yunnanensis*	5.5-10.0	7.0-7.5	30-66	60	0-3.5	0.3	+	⊥	+	+
12	DSM 19169^{T}	*A. mongoliensis*	5.0-11.0	8.0	35-75	60	0-5.0	0-0.5	+	+	+	+
13	DSM 27374^{T}	*A. suryakundensis*	5.5-11.5	7.5	40-60	55	0-3.5	1.0	+	+	+	+
14	DSM 21706^{T}	*A. kaynarcensis*	5.5-10.0	7.0	35-70	60	0-4.0	0.5	⊥	+	-	-

5.2.3. API-20E VE API-50CH KİTLERİYLE GERÇEKLEŞTİRİLEN BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI

İzolatların ve filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerin API-20E ve API-50CH kitleriyle gerçekleştirilen biyokimyasal test sonuçları Çizelge 5.6'da detaylı bir şekilde verilmiştir. API-20E ve API-50CH kitleriyle gerçekleştirilen biyokimyasal test sonuçlarına göre; arbutin ve salisin karbohidrat fermentasyon testleri dışında her iki izolatın aynı sonuçlara sahip olduğu, ancak akraba oldukları referans türlerden bu analizler yönünden farklılıklar gösterdikleri saptanmıştır.

Çizelge 5.6. İzolatların ve filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerin API-20E ve API-50CH kitleriyle gerçekleştirilen biyokimyasal test sonuçları

Test adı	Bakteriler													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
API 20E kiti kapsamındaki testler														
ß-galaktosidaz (ONPG) testi	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Arjinin dihidrolaz reaksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lizin dekarboksilaz reaksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitin dekarboksilaz reaksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Sitrat kullanımı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H_2S üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre kullanımı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triptofan deaminaz reaksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asetoin üretimi (Voges-Proskauer testi)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Jelatin kullanımı	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Nitratın nitrite indirgenmesi	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitratın N_2 gazına indirgenmesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
API 50CH kiti kapsamındaki karbohidrat fermentasyon testleri														
Gliserol	-	-	+	⊥	-	-	-	+	-	+	+	-	+	⊥
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinoz	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
D-riboz	-	-	-	-	⊥	⊥	⊥	-	+	-	+	+	+	+
D-ksiloz	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
L-ksiloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-βD-ksilopiranozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galaktoz	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
D-glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fruktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannoz	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

Çizelge 5.6. (devam)

Test adı	Bakteriler													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
API 50CH kiti kapsamındaki karbohidrat fermentasyon testleri														
L-sorboz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ramnoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulsitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İnositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metil-αD-mannopiranozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metil-α-D-glukopiranozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-asetilglukozamin	-	-	-	-	⊥	⊥	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalin	+	+	+	-	-	+	⊥	+	-	-	+	-	-	+
Arbutin	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Eskülin (ferrik sitrat)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salisin	+	-	⊥	-	+	+	⊥	-	-	-	+	-	-	-
D-sellobioz	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D-maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melibioz	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
D-sukroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İnulin	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-melezitoz	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
D-raffinoz	+	+	+	+	+	+	⊥	-	-	+	-	+	-	+
Amidon (nişasta)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glikojen	+	+	+	+	+	+	+	⊥	+	+	+	+	+	+
Ksilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentibioz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-turanoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-likoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fukoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fukoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Potasyum glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Potasyum 2-ketoglukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Potasyum 5-ketoglukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kısaltmalar: 1; E184aa, **2;** E208a, **3;** *A. salavatliensis* DSM 22626^T, **4;** *A. gonensis* NCIMB 13933^T, **5;** *A. ayderensis* NCIMB 13972^T, **6;** *A. kestanbolensis* NCIMB 13971^T, **7;** *A. flavithermus* DSM 2641^T, **8;** *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, **9;** *A. thermarum* DSM 17141^T, **10;** *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T, **11;** *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T, **12;** *A. mongoliensis* DSM 19169^T, **13;** *A. suryakundensis* DSM 27374^T, **14;** *A. kaynarcensis* DSM 21706^T, ⊥: zayıf pozitif.

5.2.4. ANTİBİYOGRAM SONUÇLARI

İzolatların ve filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerin 10 farklı antibiyotik için test edildikleri antibiyogram sonuçları karşılaştırıldığında, E208a hariç E184aa ve diğer tüm *Anoxybacillus* referanslarının, bu antibiyotiklere karşı beklendiği üzere duyarlı oldukları görülmüştür. Ancak, CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) 2007 standart değerlerine (372) göre, E208a izolatı diğerlerinden farklı olarak 30 µg kanamisine dirençli bulunmuştur. Yapılan disk difüzyon testlerinde kullanılan antibiyotikler ve antibiyogram sonuçları (oluşan zon çapları) Çizelge 5.7'de gösterilmiştir.

Sonuç olarak, Çizelge 5.5, 5.6 ve 5.7'lerde sunulan fenotipik karakterizasyon test sonuçlarına göre; tür teşhisi yapılan izolatlar ve referans türler arasında özellikle koloni ve spor morfolojileri, üreme fizyolojileri, bazı biyokimyasal testler ve antibiyogram sonuçları açısından farklılıklar olduğu görülmüştür. E184aa ve E208a izolatlarının ise özellikle pH istekleri, tuza toleransları, kalitatif katalaz ve oksidaz aktiviteleri, flagella tipleri, şişkin spor yapıları ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları bakımından farklılık gösterdikleri açıkça ortaya konulmuştur.

Çizelge 5.7. İzolatların ve filogenetik olarak akraba oldukları referans türlerin antibiyogram sonuçları (zon çapı R: mm)

Sıra	Bakteri Kodu	Türü	Azitromisin (15 µg)	Rifampisin (30 µg)	Kanamisin (30 µg)	Novobiosin (30 µg)	Tetrasiklin (30 µg)	Penisilin G (10 U)	Bazitrasin (10 U)	Neomisin (30 µg)	Kloramfenikol (30 µg)	Vankomisin (30 µg)
1	E184aa	*Anoxybacillus* sp.	25,5	36	18,5	25	38,5	49	27,5	18	26	19,5
2	E208a	*Anoxybacillus* sp.	17	39,5	**14**	43	40	50,5	40	20	29	21
3	DSM 22626^{T}	*A.salavatliensis*	29,5	35,5	22,5	19,5	41	52	29	19,5	27	25
4	NCIMB 13933^{T}	*A. gonensis*	26	42	26	22	37	58	31	19,5	31	25
5	NCIMB 13972^{T}	*A. ayderensis*	27	35,5	20	25	37,5	51	30	19,5	30	23,5
6	NCIMB 13971^{T}	*A. kestanbolensis*	31	42	21,5	29	37	52	35	20,5	28	26
7	DSM 2641^{T}	*A. flavithermus*	27	43,5	22	25	39	51	34,5	21	27,5	21,5
8	DSM 14988^{T}	*A. kamchatkensis*	27,5	38	19	28	33,5	47	31	17	29	20
9	DSM 17141^{T}	*A. thermarum*	23	25	22	18,5	29	48,5	15	15	27,5	17
10	DSM 18475^{T}	*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*	30	41	24,5	25,5	37,5	51	29	21,5	31	25,5
11	KCTC 13759^{T}	*A. flavithermus* subsp. *yunnanensis*	25,5	23,5	22	20	34	42	16	20,5	29	20
12	DSM 19169^{T}	*A. mongoliensis*	30,5	37	22	25	41	48,5	30	22	30	27
13	DSM 27374^{T}	*A. suryakundensis*	25,5	21	20,5	20	31	47	14,5	17	25	18,5
14	DSM 21706^{T}	*A. kaynarcensis*	26,5	40,5	21,5	20	41	47	31	22	31	27

5.3. İZOLATLARIN TÜR SEVİYESİNDE TANIMLANMASI İÇİN HİZMET ALIMI ŞEKLİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN DİĞER GENOTİPİK VE KEMOTAKSONOMİK ANALİZLERİN SONUÇLARI

E184aa ve E208a izolatlarının kesin tür teşhislerinin yapılması için gerekli ve Almanya'daki DSMZ Enstitüsü'nde hizmet alımı şeklinde yaptırılmış olan analizlerin sonuçları bu kısımda sunulmuştur.

5.3.1. E184aa VE E208a İZOLATLARININ TOPLAM HÜCRE YAĞ ASİTİ ANALİZİ SONUÇLARI

E184aa ve E208a izolatlarının DSMZ'den hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilen toplam hücre yağ asiti analizi sonuçları Çizelge 5.8'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre; oranlarda değişiklik görülse de iso-dallanmış yağ asitleri (iso-$C_{15:0}$ ve iso-$C_{17:0}$) izolatlardaki toplam yağ asitlerinin % 75'inden fazlasını oluşturup, temel yağ asitleri olarak göze çarpmaktadır. E184aa izolatı için önemli hücresel yağ asitleri iso-$C_{15:0}$ (% 51.02), iso-$C_{17:0}$ (% 25.11) ve $C_{16:0}$ (% 8.85) olmakla birlikte, az miktarda da iso-$C_{16:0}$ (% 4.83) ve anteiso-$C_{17:0}$ (% 3.64) yağ asitlerine sahip olduğu görülmektedir. E208a izolatı için de önemli hücresel yağ asitlerinin aynı şekilde iso-$C_{15:0}$ (% 51.66), iso-$C_{17:0}$ (% 23.83) ve $C_{16:0}$ (% 9.63) olduğu, daha az oranda bulunan iso-$C_{16:0}$ (% 3.26) ve anteiso-$C_{17:0}$ (% 3.28) yağ asitlerine de sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca, E208a izolatında, E184aa'dan farklı olarak iso-$C_{13:0}$ (% 0.18) ve $C_{18:0}$ (% 0.24) yağ asitleri de az miktarda bulunmaktadır.

Çizelge 5.8. E184aa ve E208a izolatlarının toplam hücre yağ asiti oranları

Yağ asitleri (%)	E184aa	E208a
iso-$C_{13:0}$	-	0.18
$C_{14:0}$	1.19	1.55
iso-$C_{14:0}$	0.33	0.27
$C_{15:0}$	0.31	0.34
iso-$C_{15:0}$	**51.02**	**51.66**
anteiso-$C_{15:0}$	1.65	1.49
$C_{16:0}$	**8.85**	**9.63**
iso-$C_{16:0}$	4.83	3.26
iso-$C_{17:0}$	**25.11**	**23.83**
anteiso-$C_{17:0}$	3.64	3.28
iso-$C_{17:1}$*w5c*	1.55	1.96
$C_{18:0}$	-	0.24
$C_{16:1}$ iso I veya $C_{14:0}$ 3-OH*	0.40	0.29
$C_{15:0}$ iso 2-OH veya $C_{16:1}$ *w7c**	1.14	2.02
Toplam (%)	100	100

* isimlendirilemeyen pik

5.3.2. E184aa VE E208a İZOLATLARININ MENAKİNON ANALİZ SONUÇLARI

Menakinon analizleri sonucunda, izolatların *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin hücre zarlarında da dominant olarak bulunan, % 94 ve üzerinde MK-7 içerdikleri belirlenmiştir (Çizelge 5.9).

Çizelge 5.9. E184aa ve E208a izolatlarının menakinon analizi sonuçları

Bakteri Kodu	MK-5 (%)	MK-6 (%)	MK-7 (%)
E184aa	3	3	**94**
E208a	1	3	**96**

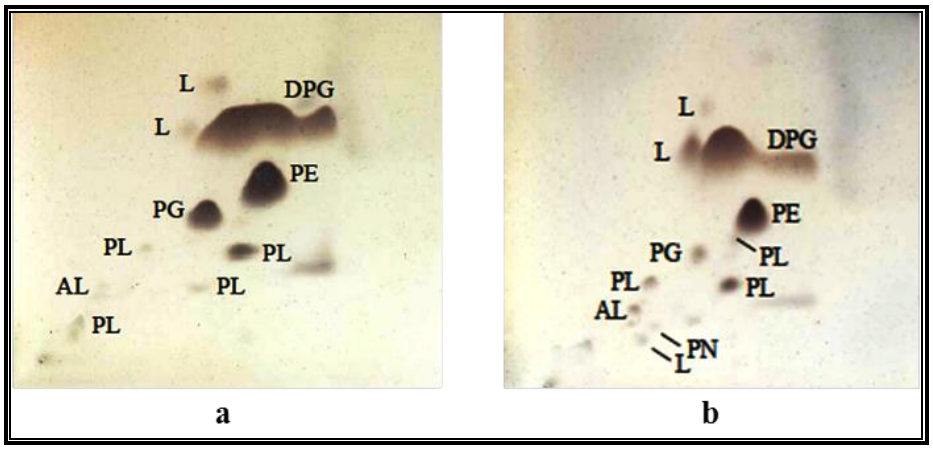
5.3.3. E184aa VE E208a İZOLATLARININ POLAR LİPİD ANALİZİ SONUÇLARI

Hücre zarındaki polar lipid analizleri sonucunda, izolatların polar lipid içerikleri Çizelge 5.10'da ve buna ait TLC kromatografisi görüntüleri ise Şekil 5.15'te sunulmuştur.

Çizelge 5.10. E184aa ve E208a izolatlarının polar lipid analizi sonuçları

Bakteri Kodu	L	AL	PL	PN	PG	PE	DPG
E184aa	x	x	x	-	x	x	x
E208a	x	x	x	x	x	x	x

Kısaltmalar: L: Lipid, AL: Aminolipid, PL: Fosfolipid, PN: Fosfoaminolipid, PG: Fosfatidil gliserol, PE: Fosfatidil etanolamin, DPG: Difosfatidil gliserol



Şekil 5.15. **a.** E184aa ve **b.** E208a izolatlarının polar lipid içeriklerini gösteren TLC kromatografisi görüntüleri
Kısaltmalar: L: Lipid, AL: Aminolipid, PL: Fosfolipid, PN: Fosfoaminolipid, PG: Fosfatidil gliserol, PE: Fosfatidil etanolamin, DPG: Difosfatidil gliserol

Bu sonuçlara göre; E184aa izolatının, E208a'dan farklı olarak fosfoaminolipid (PN) içermediği görülmektedir. Ayrıca, Şekil 5.15'te de görüldüğü üzere; E184aa izolatı gerek

lipid (L) ve fosfolipid (PL) sayısı ve miktarı açısından, gerekse diğer polar lipid içeriklerinin miktarları bakımından E208a izolatından minör farklılıklar göstermektedir.

5.3.4. E184aa VE E208a İZOLATLARININ DİAMİNOPİMELİK ASİT (DAP) ANALİZİ SONUÇLARI

E184aa ve E208a izolatlarının hücre duvarında peptidoglikanın tanılayıcı diamino asit olarak mezo-diaminopimelik asit (*meso*-Dpm) içerdiği tespit edilmiştir. *meso*-Dpm içeriği, genellikle Gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki tetrapeptit çapraz bağlanması durumunda görülmektedir.

5.3.5. E184aa VE E208a İZOLATLARININ GENOMLARINDAKİ % G+C İÇERİĞİ SONUÇLARI

Genetik yapıyı oluşturan guanin ve sitozin baz dizilerinin genomdaki miktarı, bakteriden bakteriye göre değişiklik göstermekte olup (24-76 % mol), tür teşhisinde önemli kriterlerdendir. E184aa ve E208a izolatlarının genomik DNA'larına ait G+C (% mol) içerikleri, Almanya'daki DSMZ İdentifikasyon Servisi'nde belirlenmiştir. Her iki izolatın da *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin içerdiği % GC içeriklerine yakın değerlerde G+C (% mol) oranlarına sahip oldukları görülmektedir. 16S rRNA gen dizilerinin % G+C içerikleri ise elde edilen 1426 bç'lik baz dizilerinden ENDMEMO (DNA/RNA GC Content Calculator) programı kullanılarak hesaplanmıştır (http://www.endmemo.com/bio/tm.php, 373), (Çizelge 5.11).

Çizelge 5.11. E184aa ve E208a izolatlarının genomik DNA ve 16S rRNA % G+C içerikleri

Bakteri Kodu	Genomik DNA G+C içeriği (% mol)	16S rRNA G+C içeriği (% mol)
E184aa	41.9	56.59
E208a	42.2	56.73

5.3.6. E184aa VE E208a İZOLATLARININ DNA-DNA HİBRİDİZASYON ANALİZİ SONUÇLARI

DSMZ İdentifikasyon Servisi'ne hizmet alımı şeklinde yaptırılmış olan DNA-DNA hibridizasyon testleri, izolatların 16S rRNA genine ait filogenetik analizler sonucunda en çok dizi benzerliği gösterdikleri suşlar ile gerçekleştirilmiştir. Bunun dışında,

gerçekleştirilen ARDRA, ITS-PCR, BOXA1 ve $(GTG)_5$-PCR gibi moleküler analizler ile fenotipik analizler sonucunda; E184aa izolatının % 96.5-97.0 ve E208a izolatının ise % 97.0-97.7 değişen oranlarda 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdikleri *A. thermarum* DSM 17141^T, *A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. mongoliensis* DSM 19169^T, *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T ve *A. kaynarcensis* DSM 21706^T referans türleri ile genomik DNA parmak izi profilleri ve diğer test sonuçları yönünden oldukça farklı oldukları tespit edildiğinden, bu referans türlerle DNA-DNA hibridizasyon analizlerinin yapılmasına gerek duyulmamıştır.

E184aa ve E208a izolatlarının birbirleri ve en çok 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdikleri referans türler ile gerçekleştirilen DNA-DNA hibridizasyon analiz sonuçları Çizelge 5.12.'de sunulmuştur. Ayrıca, literatür çalışmalarında *A. gonensis* NCIMB 13933^T, *A. ayderensis* NCIMB 13972^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. salavatliensis* DSM 22626^T ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T türleri için yürütülmüş DDH analizi sonuçları Çizelge 5.13'de sunulmuştur. Bu sonuçlara göre; E184aa ve E208a izolatları, birbirlerine % 99.4 oranında 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdiklerinden, kendi aralarında hibridize edilmişler ve % 81.2 oranında benzer oldukları görülmüştür. Bu sonuçlara göre, her iki izolatın da aynı tür bakteriler oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, *ad hoc* komitesinin önerdiği ve yeni bir bakteriyel türün tanımında gerekli görülen % 70 DNA-DNA benzerlik oranı (7) göz önüne alındığında, E184aa ve E208a izolatlarının, *A. ayderensis* NCIMB 13972^T hariç (sırasıyla, % 19.7 ve % 12.9 oranında benzerlik) birbirlerine ve hibridizasyon yapılan 4 referans türe beklenilenin aksine % 70'den fazla benzerlik gösterdikleri görülmüştür. Deneyler en az iki tekrarlı olarak yürütülmüş olup, E184aa ve E208a izolatlarının aynı zamanda en yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliği de gösterdikleri *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T alt türüne, en çok sırasıyla 82.2 (SS ± 3.8) ve 90.3 (SS ± 5.9) % mol oranlarında genomik DNA benzerliği göstermişlerdir. Ancak, bir bakteri sadece bir bakteriyel türe % 70'den fazla DNA-DNA hibridizasyon benzerliği gösterebilmektedir (7). Elde edilen bulgularda, izolatlar *A. gonensis* NCIMB 13933^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. salavatliensis* DSM 22626^T ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T referans türlerin her birine % 70'den fazla DNA-DNA homolojisi gösterdiklerinden, izolatların tür tanımları tam olarak netleştirilememiştir. Ayrıca, Cihan ve ark. (2011) tarafından tanımlanan *A. salavatliensis* türünün (82) yanı sıra Dulger ve ark. (2004) tarafından gerçekleştirilen *A. ayderensis* türünün tanımlanmasına yönelik çalışmada (73) *A. ayderensis* ve *A. gonensis* türlerinin

DNA hibridizasyon analizleri de bu çalışmada olduğu gibi DSMZ Enstitüsü tarafından gerçekleştirilmiştir (Çizelge 5.13). İzolatların tanımlanan bu referans türlerin hangisine dahil olduklarını kesinleştirmek amacıyla, öncelikle bu referans türlerin kendi içlerinde hibridize edilmesi ve benzerlik oranlarının teyit edilmesi gerektiğinden, bu ilave hibridizasyon analizleri DSMZ Enstitüsü'nden yeniden talep edilmiştir. DSMZ Enstitüsü'nde yürütülen son DNA-DNA hibridizasyon analiz sonuçları, *A. kamchatkensis* türü için elde edilen hibridizasyon sonuçları sınır değerlerde olduğu için, özellikle *A. gonensis*, *A. salavatliensis* ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* referans türlerinin aslında tek bir tür altında toplanması gerektiğini kesin olarak ortaya koymuştur. *A. gonensis* NCIMB 13933^T, *A. ayderensis* NCIMB 13972^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. salavatliensis* DSM 22626^T ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T referans türlerinin birbirleri ile gerçekleştirilen DNA-DNA hibridizasyon çiftlerinin benzerlik oranları da Çizelge 5.12'de sunulmuştur. Tüm bu veriler, tür tanımlama çalışmalarında, diğer fenotipik, genotipik ve kemotaksonomik analizler neticesinde bakteri izolatları arasında farklılıklar saptanmış olmasına karşın, asıl belirleyici olanın doğru optimizasyon koşullarında gerçekleştirilen hibridizasyon testlerinin olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, tez çalışması kapsamında yapılması hedeflenen tür tanımlama testlerinin tümü gerçekleştirilmiş, ancak elde edilen bu hibridizasyon sonuçlarına göre; E184aa ve E208a izolatları yeni bir *Anoxybacillus* türüne dahil edilememiş, bunun yerine *A. gonensis* NCIMB 13933^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. salavatliensis* DSM 22626^T ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T referans türleri ile ilişkili bakteriler oldukları kesinlik kazanmıştır. Bu durum, öngöremediğimiz şekilde, izolatlarımızın yeni bir türe dahil edilmesi yerine, izolatlarımız ile yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliği de gösteren bu 4 türün doğru bir hiyerarşik pozisyonda sınıflandırılmasını sağlayacak şekilde *Anoxybacillus* cinsinin taksonomik revizyonunun yapılmasını gerektirmektedir. Elde edilen tüm bu sonuçlar, *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin daha doğru bir şekilde sınıflandırılabilmesinin önünü açması yönünden önem taşımaktadır.

Çizelge 5.12. E184aa ve E208a izolatlarının birbirleri ve en çok 16S rRNA gen dizi homolojisi gösterdiği referans türlerle ve bu referans türlerin birbirleri ile gerçekleştirilen DNA-DNA hibridizasyon çiftlerinin benzerlik oranları (2 X SSC, 68ºC), (SS: standart sapma)

Hibridizasyon çiftleri	**E184aa**	**E208a**	***A. gonensis* NCIMB 13933^T**	***A. ayderensis* NCIMB 13972^T**	***A. kamchatkensis* DSM 14988^T**	***A. salavatliensis* DSM 22626^T**
E208a	81.2 % mol (SS: ± 5.4)	-				
A. gonensis NCIMB 13933^T	80.9 % mol (SS: ± 5.3)	84.2 % mol (SS: ± 4.7)	-			
A. ayderensis NCIMB 13972^T	19.7 % mol (SS: ± 4.1)	12.9 % mol (SS: ± 1.8)	9.0 % mol (SS: ± 0.14)	-		
A. kamchatkensis DSM 14988^T	77.6 % mol (SS: ± 1.6)	78.6 % mol (SS: ± 6.1)	61.9 % mol (SS: ± 0.95)	14.6 % mol (SS: ± 6.2)	-	
A. salavatliensis DSM 22626^T	78.7 % mol (SS: ± 3.5)	80.2 % mol (SS: ± 6.2)	83.1 % mol (SS: ± 0.8)	23.1 % mol (SS: ± 5.8)	84.9 % mol (SS: ± 2.0)	-
A. kamchatkensis subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T	**82.2** % mol (SS: ± 3.8)	**90.3** % mol (SS: ± 5.9)	76.6 % mol (SS: ± 1.4)	32.3 % mol (SS: ± 5.1)	71.0 % mol (SS: ± 2.0)	80.3 % mol (SS: ± 0.05)

Çizelge 5.13. *A. gonensis* NCIMB 13933^T, *A. ayderensis* NCIMB 13972^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. salavatliensis* DSM 22626^T ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T referans türlerinin daha önceki literatür çalışmalarında birbirleri ile gerçekleştirilen DNA-DNA hibridizasyon çiftlerinin benzerlik oranları (* hibridizasyon analizleri DSMZ Enstitüsünde yürütülen çaprazlamalar; HE: hibridize edilmedi)

Hibridizasyon çiftleri	***A. gonensis* NCIMB 13933^T**	***A. ayderensis* NCIMB 13972^T**	***A. kamchatkensis* DSM 14988^T**	***A. salavatliensis* DSM 22626^T**
A. ayderensis NCIMB 13972^T	68.6 % mol ([73])* 61.0 % mol ([152])	-		
A. kamchatkensis DSM 14988^T	51.0 % mol ([152])	51.0 % mol ([152])	-	
A. salavatliensis DSM 22626^T	HE	HE	49.7 % mol ([82])*	-
A. kamchatkensis subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T	48.0 % mol ([153])	42.0 % mol ([153])	67.5 % mol (65.1, 66.7, 70.7) ([153])	HE

5.4. E184aa VE E208a İZOLATLARININ ULUSLARARASI İKİ KÜLTÜR KOLEKSİYONUNDAN ALINAN KÜLTÜR KOLEKSİYON NUMARALARI

Her iki izolatın bakteri kültürleri, depolanmak üzere Almanya'daki DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) ve İngiltere'deki NCIMB (National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria) olmak üzere iki farklı uluslararası kültür koleksiyonuna gönderilmiş olup, E184aa izolatı için DSM 103588 = NCIMB 15051 ve E208a için ise DSM 103587 = NCIMB 15048 kültür koleksiyon numaraları temin edilmiştir.

5.5. α-AMİLAZ AKTİVİTESİNİN KALİTATİF VE KANTİTATİF ANALİZ SONUÇLARI

5.5.1. α-AMİLAZ AKTİVİTESİNİN KALİTATİF TAYİNİ

6 *Anoxybacillus* izolatı (A321, A3210, D222b, E184aa, E184ab ve E208a) ve 20 referans türün kalitatif olarak tespit edilen α-amilaz aktivite zonları ve oluşan zonların büyüklüğüne göre α-amilaz aktivitelerinin değerlendirilmesi yapılmış olup, elde edilen sonuçlar Çizelge 5.14'te sunulmuştur. Buna göre, E184ab (+++), E184aa (+++), D222b (+++), E208a (++), A321 (+) ve A3210 (+) izolatlarının tamamı yüksek amilolitik aktivite göstermiştir. Çizelge 5.14'te de görüldüğü üzere, tüm *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin farklı miktarlarda da olsa amilolitik aktiviteye sahip oldukları sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, yüksek amilolitik aktivite gösteren 6 *Anoxybacillus* izolatı ve 20 referans tür olmak üzere 26 bakterinin kantitatif amilaz aktivite tayininin yapılmasına karar verilmiştir.

5.5.2. α-AMİLAZ AKTİVİTESİNİN KANTİTATİF TAYİNİ

Çizelge 5.14'te belirtilen 6 *Anoxybacillus* izolatı (A321, A3210, D222b, E184aa, E184ab ve E208a) ve 20 referans türün hücre dışı α-amilaz aktiviteleri, substrat olarak çözünebilir % 2'lik nişastayı hidroliz edebilme yeteneklerine göre spektrofotometrik ölçümler neticesinde kantitatif olarak belirlenmiştir. İzolat ve referansların herbirinin üç tekrarlı çalışılmış kantitatif amilaz aktivitesi sonuçlarının ortalama değerleri (standart sapma ve hata değerleri ile birlikte), her bir bakteri için kullanılan enzim üretim besiyerinin ve enzim aktivitesinin gerçekleştirildiği optimum sıcaklık ve pH değerleri Çizelge 5.14'te sunulmaktadır.

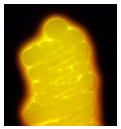
Çizelge 5.14. İzolatların ve referansların kalitatif ve kantitatif α-amilaz aktivitesi sonuçları (SS: standart sapma, SH: standart hata)

Sıra no	İzolat kodu/ Kültür koleksiyon no	Kalitatif amilaz aktivitesi		Kantitatif amilaz aktivitesi																					
						1. tekrar					2. tekrar					3. tekrar					3 tekrarın ortalaması			
		α-Amilaz aktivite zonu	Oluşan zonun derecesi	T_{opt} (°C)	pH_{opt}	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH
1	E184ab		+++	65	7.0	0,020	**6,41**	**320,6**	0,888	0,628	0,021	**4,97**	**236,9**	0,157	0,111	0,020	**6,43**	**321,5**	0,103	0,073	**5,94**	**293,0**	0,383	0,271
2	E184aa		+++	65	7.0	0,021	**6,50**	**309,7**	0,186	0,132	0,015	**4,71**	**314,3**	0,070	0,049	0,015	**6,00**	**399,8**	0,124	0,088	**5,74**	**341,3**	0,127	0,090
3	DSM 22		+++	65	7.0	0,036	**5,51**	**153,0**	0,087	0,062	0,028	**5,53**	**197,6**	0,174	0,123	0,028	**5,53**	**197,5**	0,061	0,043	**5,52**	**182,7**	0,107	0,076
4	DSM 2641		+++	65	7.0	0,046	**5,02**	**109,2**	0,153	0,108	0,034	**4,76**	**140,1**	0,321	0,227	0,046	**5,00**	**108,7**	0,113	0,080	**4,93**	**119,3**	0,196	0,138
5	D222b		+++	65	7.0	0,034	**5,12**	**150,5**	0,038	0,027	0,015	**4,33**	**288,4**	0,156	0,110	0,016	**4,98**	**311,2**	0,152	0,108	**4,81**	**250,0**	0,115	0,082
6	DSM 22626		+++	65	7.0	0,034	**3,10**	**91,2**	0,030	0,022	0,041	**3,43**	**83,8**	0,101	0,072	0,051	**3,29**	**64,5**	0,145	0,102	**3,28**	**79,8**	0,092	0,065

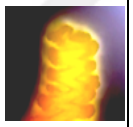
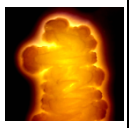
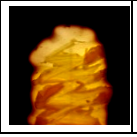
Çizelge 5.14. (devam)

Sıra no	İzolat kodu/ Kültür koleksiyon no	Kalitatif amilaz aktivitesi		Kantitatif amilaz aktivitesi																				
				T_{opt} (°C)	pH_{opt}	1. tekrar					2. tekrar					3. tekrar					3 tekrarın ortalaması			
		α-Amilaz aktivite zonu	Oluşan zonun derecesi			Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH
7	DSM 15939		+++	65	7.0	0,043	**3,28**	**76,3**	0,097	0,069	0,051	**2,04**	**39,9**	0,139	0,098	0,045	**4,33**	**96,3**	0,127	0,090	**3,22**	**70,8**	0,121	0,086
8	NCIMB 13971		++	55	8.0	0,039	**1,10**	**28,2**	0,060	0,043	0,057	**1,18**	**20,8**	0,008	0,006	0,055	**1,21**	**22,0**	0,027	0,019	**1,17**	**23,7**	0,032	0,022
9	NCIMB 13972		++	55	8.0	0,057	**0,63**	**11,1**	0,032	0,023	0,070	**0,65**	**9,3**	0,006	0,004	0,042	**0,72**	**17,0**	0,031	0,022	**0,67**	**12,5**	0,023	0,016
10	DSM 18475		++	55	7.5	0,088	**0,73**	**8,2**	0,017	0,012	0,100	**0,64**	**6,4**	0,014	0,010	0,084	**0,61**	**7,2**	0,012	0,009	**0,66**	**7,3**	0,014	0,010
11	DSM 17075		+	55	7.5	0,017	**0,56**	**33,0**	0,008	0,006	0,021	**0,51**	**24,2**	0,029	0,021	0,010	**0,48**	**48,3**	0,019	0,013	**0,52**	**35,2**	0,019	0,013
12	DSM 16325		+	55	7.5	0,019	**0,51**	**26,7**	0,036	0,025	0,015	**0,53**	**35,0**	0,005	0,003	0,016	**0,50**	**31,3**	0,031	0,022	**0,51**	**31,0**	0,024	0,017
13	DSM 7		+++	37	7.0	0,010	**0,54**	**54,4**	0,056	0,040	0,017	**0,45**	**26,4**	0,059	0,042	0,017	**0,39**	**23,1**	0,056	0,039	**0,46**	**34,6**	0,057	0,040

Çizelge 5.14. (devam)

Sıra no	İzolat kodu/ Kültür koleksiyon no	Kalitatif amilaz aktivitesi		Kantitatif amilaz aktivitesi																					
						1. tekrar					2. tekrar					3. tekrar					3 tekrarın ortalaması			
		α-Amilaz aktivite zonu	Oluşan zonun derecesi	T_{opt} (°C)	pH_{opt}	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH
14	E208a		++	65	7.0	0,001	**0,40**	**396,8**	0,010	0,007	0,008	**0,33**	**41,9**	0,000	0,000	0,007	**0,37**	**53,5**	0,012	0,009	**0,37**	**164,0**	0,008	0,005
15	DSM 27374		+	55	7.5	0,051	**0,28**	**5,4**	0,012	0,008	0,048	**0,28**	**5,9**	0,012	0,008	0,061	**0,28**	**4,6**	0,022	0,015	**0,28**	**5,3**	0,015	0,011
16	NCIMB 13933		++	55	7.5	0,028	**0,26**	**9,3**	0,018	0,012	0,025	**0,28**	**11,4**	0,011	0,008	0,015	**0,27**	**18,0**	0,008	0,006	**0,27**	**12,9**	0,012	0,009
17	DSM 19169		+	60	8.0	0,035	**0,27**	**7,6**	0,008	0,006	0,035	**0,23**	**6,6**	0,006	0,004	0,026	**0,21**	**8,2**	0,009	0,006	**0,24**	**7,5**	0,008	0,005
18	DSM 17127		+	55	6.5	0,056	**0,25**	**4,4**	0,006	0,004	0,057	**0,21**	**3,6**	0,005	0,003	0,056	**0,20**	**3,6**	0,005	0,003	**0,22**	**3,9**	0,005	0,004
19	A321		+	65	7.0	0,017	**0,19**	**11,3**	0,004	0,003	0,019	**0,19**	**9,9**	0,009	0,006	0,005	**0,23**	**46,2**	0,007	0,005	**0,20**	**22,5**	0,007	0,005

Çizelge 5.14. (devam)

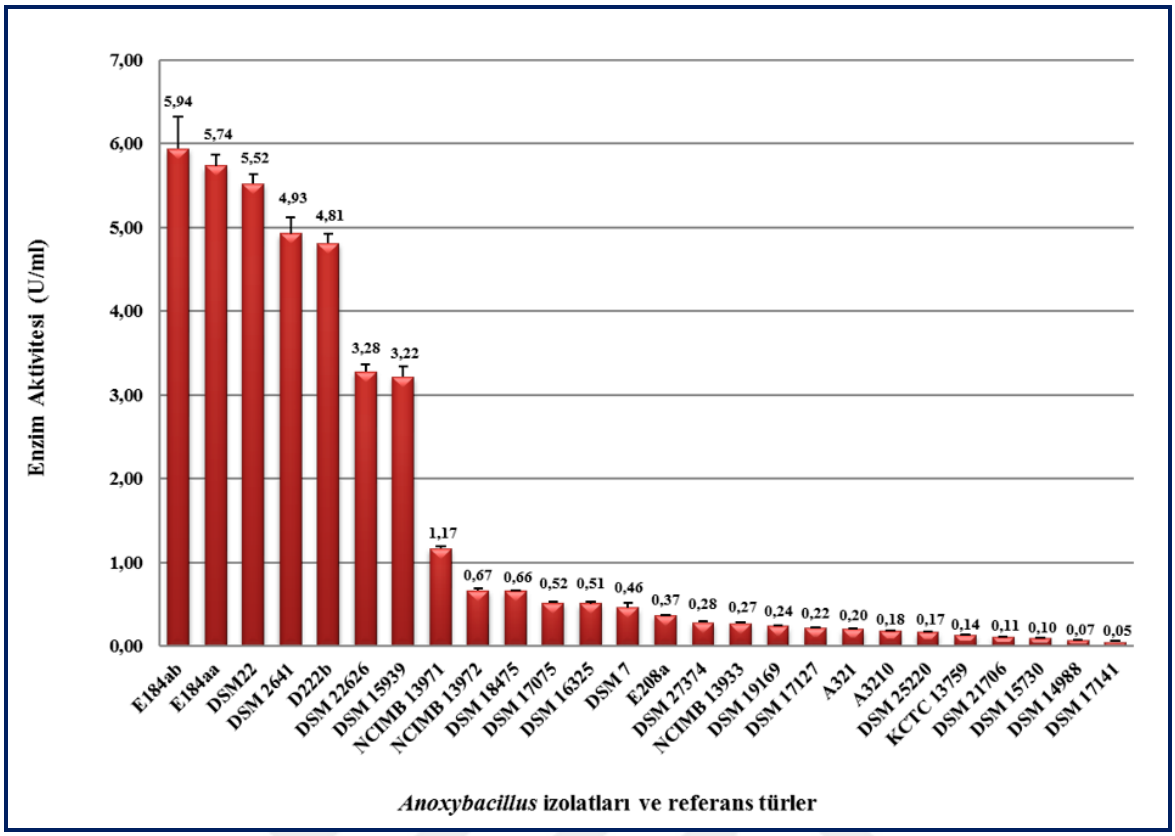
Sıra no	İzolat kodu/ Kültür koleksiyon no	Kalitatif amilaz aktivitesi		Kantitatif amilaz aktivitesi																					
						1. tekrar					2. tekrar					3. tekrar					3 tekrarın ortalaması			
		α-Amilaz aktivite zonu	Oluşan zonun derecesi	T_{opt} (°C)	pH_{opt}	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH
20	A3210		+	65	7.0	0,006	**0,19**	**32,5**	0,000	0,000	0,008	**0,17**	**21,5**	0,009	0,006	0,011	**0,17**	**15,9**	0,003	0,002	**0,18**	**23,3**	0,004	0,003
21	DSM 25220		⊥	55	8.0	0,044	**0,19**	**4,3**	0,007	0,005	0,036	**0,17**	**4,8**	0,005	0,004	0,045	**0,15**	**3,2**	0,009	0,006	**0,17**	**4,1**	0,007	0,005
22	KCTC 13759		⊥	60	7.0	0,094	**0,12**	**1,3**	0,008	0,005	0,069	**0,16**	**2,3**	0,003	0,002	0,059	**0,13**	**2,2**	0,000	0,000	**0,14**	**1,9**	0,004	0,003
23	DSM 21706		+	60	7.0	0,014	**0,11**	**8,2**	0,000	0,000	0,014	**0,13**	**9,1**	0,004	0,003	0,009	**0,10**	**10,6**	0,000	0,000	**0,11**	**9,3**	0,001	0,001
24	DSM 15730		⊥	60	7.0	0,067	**0,12**	**1,7**	0,002	0,002	0,066	**0,07**	**1,1**	0,004	0,003	0,101	**0,10**	**1,0**	0,002	0,002	**0,10**	**1,3**	0,003	0,002
25	DSM 14988		⊥	60	8.0	0,079	**0,06**	**0,8**	0,003	0,002	0,079	**0,08**	**1,0**	0,002	0,001	0,113	**0,08**	**0,7**	0,006	0,004	**0,07**	**0,8**	0,004	0,003

Çizelge 5.14. (devam)

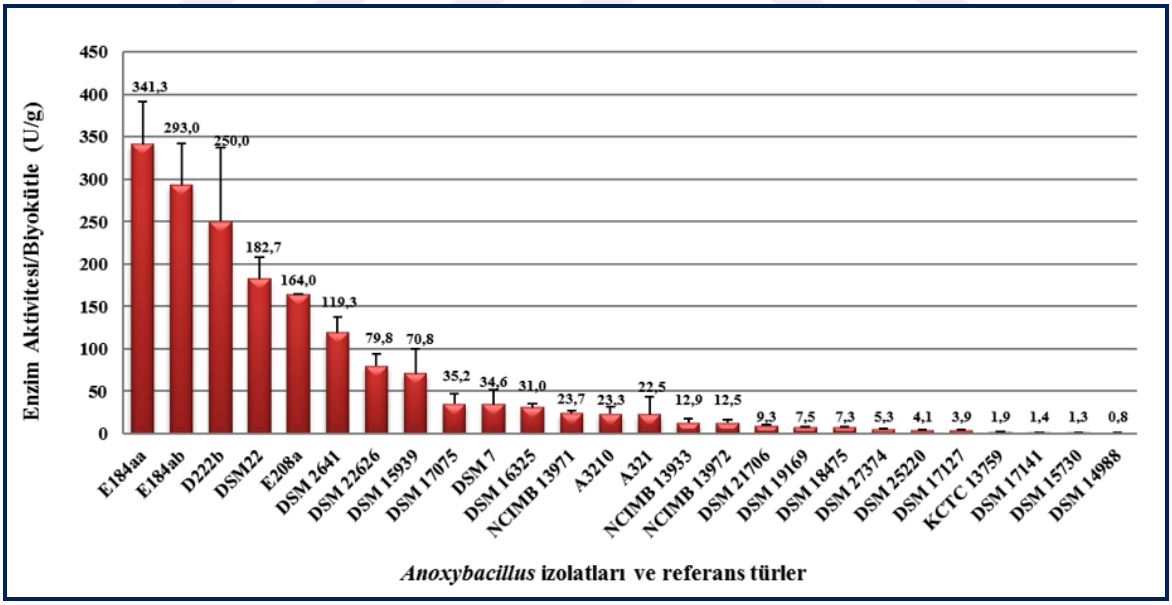
Sıra no	İzolat kodu/ Kültür koleksiyon no	Kalitatif amilaz aktivitesi		Kantitatif amilaz aktivitesi																				
						1. tekrar					2. tekrar					3. tekrar					3 tekrarın ortalaması			
		α-Amilaz aktivite zonu	Oluşan zonun derecesi	T_{opt} (°C)	pH_{opt}	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Pelet (g)	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH	Ortalama (U/mL)	Ortalama (U/g)	SS	SH
26	DSM 17141		⊥	60	7.0	0,047	**0,06**	**1,2**	0,042	0,029	0,038	**0,05**	**1,4**	0,002	0,002	0,028	**0,04**	**1,5**	0,003	0,002	**0,05**	**1,4**	0,016	0,011

Kısaltmalar: DSM 22: *Geobacillus stearothermophilus*; DSM 2641: *A. flavithermus*; DSM 22626: *A. salavatliensis*; DSM 15939: *A. amylolyticus*; NCIMB 13971: *A. kestanbolensis*; NCIMB 13972: *A. ayderensis*; DSM 18475: *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*; DSM 17075: *A. voinovskiensis*; DSM 16325: *A. tepidamans*; DSM 7: *Bacillus amyloliquefaciens*; DSM 27374: *A. suryakundensis*; NCIMB 13933: *A. gonensis*; DSM 19169: *A. mongoliensis*; DSM 17127: *A. rupiensis*; DSM 25220: *A. calidus*; KCTC 13759: *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis*; DSM 21706: *A. kaynarcensis*; DSM 15730: *A. caldiproteolyticus*; DSM 14988: *A. kamchatkensis*; DSM 17141: *A. thermarum*

Şekil 5.16a ve 5.16b'de, 6 *Anoxybacillus* izolatının ve 20 referans suşun ortalama kantitatif α-amilaz aktivitesi (U/mL) ve ortalama enzim aktivitesi/biyokütle (U/g) değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve izolatlar en yüksek enzim üreticisinden en düşüğe doğru sıralanmıştır. Yürütülen kantitatif α-amilaz aktivite sonuçlarına göre; E184aa, E184ab ve D222b kodlu izolatların, ticari olarak termostabil amilaz üretilen *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22^T (Sigma G3651, *Bacillus stearothermophilus* α-glukozidaz) gibi bazı referans türlerden daha yüksek amilolitik aktivite göstermeleri önemlidir. Bu durum, tez çalışması kapsamında çalışılan izolatlar arasından amilaz üreticisi yeni bakteriyel gen kaynaklarının saptanması bakımından önemlidir. Sadece kantitatif amilolitik enzim aktivitesi dizinine (Çizelge 5.14 ve Şekil 5.16a) bakıldığında; sırasıyla **E184ab (5.94 U/mL), E184aa (5.74 U/mL)**, DSM 22 (5.52 U/mL), DSM 2641 (4.93 U/mL), **D222b (4.81 U/mL)**, DSM 22626 (3.28 U/mL) ve DSM 15939 (3.22 U/mL) kodlu bakteriler biyoteknolojik açıdan önemli olabilecek seviyede yüksek α-amilaz aktivitesi (5.94-3.22 U/mL) göstermişlerdir. Ayrıca, kantitatif amilolitik enzim aktivitesinin biyokütleye bölündüğü dizine (Çizelge 5.14 ve Şekil 5.16b) bakıldığında ise sıralamanın biraz değişerek biyokütle başına en çok α-amilaz üretiminin (341.3-70.8 U/g) sırasıyla, **E184aa (341.3 U/g)**, **E184ab (293.0 U/g)**, **D222b (250.0 U/g)**, DSM 22 (182.7 U/g), **E208a (164.0 U/g)**, DSM 2641 (119.3 U/g), DSM 22626 (79.8 U/g) ve DSM 15939 (70.8 U/g) kodlu bakterilere ait olduğu görülmektedir.



(a)



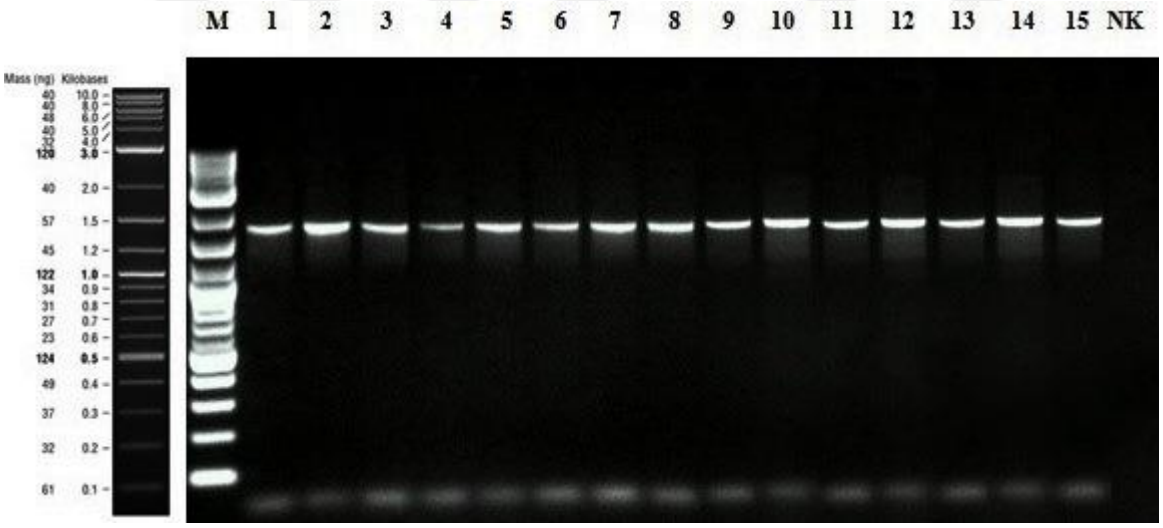
(b)

Şekil 5.16. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin **(a)** kantitatif α-amilaz aktivitesi (U/mL) sonuçları ve **(b)** kantitatif α-amilaz aktivitesi/biyokütle (U/g) değerleri

5.6. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ GEN BÖLGELERİNİN PCR İLE ÇOĞALTILMASI, DİZİLENMESİ, ANNOTASYONU, GENBANK AKSESYON NUMARALARININ TEMİNİ, AMİNO ASİT DİZİLERİNİN FİLOGENETİK VE *IN SİLİKO* ANALİZLERİNE AİT SONUÇLAR

5.6.1. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ GEN BÖLGELERİNİN PCR İLE ÇOĞALTILMASI VE DİZİ ANALİZLERİ

Çizelge 5.14'te sunulan kantitatif ve kalitatif amilaz aktivitesi sonuçlarına göre enzim aktivitesi gösteren 6 *Anoxybacillus* izolatı (A321, A3210, D222b, E184aa, E184ab ve E208a) ve 20 referans tür amilaz-PCR reaksiyonlarına alınmışlardır. *B. amyloliquefaciens* DSM 7^T ve *G. stearothermophilus* DSM 22^T referans suşları, farklı cinslere ait amilaz üreticisi suşlar olduklarından çalışmaya dahil edilmişlerdir. Amilaz geninin çoğaltılmasında kullanılan esas primer çifti olan ***amy*** primerleri (18), 6 termofilik izolatın tamamının ve toplam 18 *Anoxybacillus* referans şuşundan 9'unun nükleotidlerinin dizilenmesine imkan sağlamıştır (Şekil 5.17). Bu 15 bakteriden elde edilen PCR ürünleri, hedeflendiği üzere yaklaşık 1518 bç'lik α-amilaz geninin büyüklüğüne tekabül etmektedir.



Şekil 5.17. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin *amy* primerleri kullanılarak elde edilen α-amilaz geni-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi [1) *A. salavatliensis* (DSM 22626^T); 2) *A. gonensis* (NCIMB 13933^T); 3) *A. ayderensis* (NCIMB 13972^T); 4) *A. kestanbolensis* (NCIMB 13971^T); 5) *A. flavithermus* (DSM 2641^T); 6) *A. kamchatkensis* (DSM 14988^T); 7) *A. amylolyticus* (DSM 15939^T); 8) *A. thermarum* (DSM 17141^T); 9) *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (DSM 18475^T); 10) A3210; 11) A321; 12) E184aa; 13) E208a; 14)D222b; 15) E184ab; NK: Negatif kontrol; M: Marker (Gene 2-Log DNA Ladder 0.1-10.0 kb)]

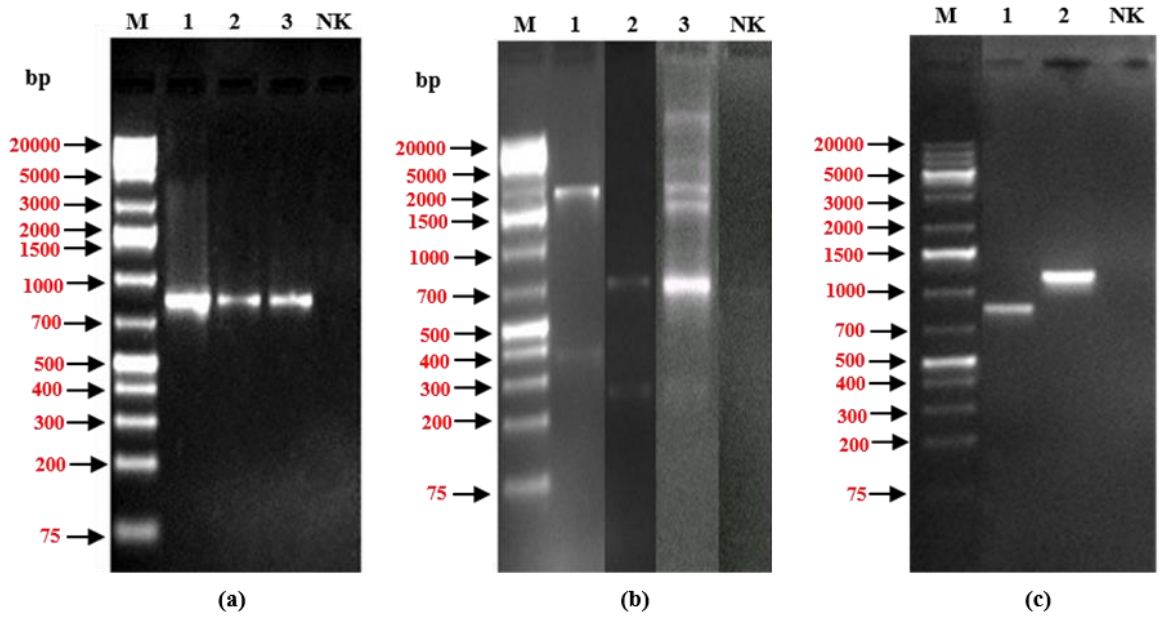
Diğer 11 bakteri amy primer çiftiyle defalarca farklı optimizasyon işlemleri denenmesine rağmen çoğaltılamamış ve bu nedenle, daha sonrasında dejenere ***d-amy*** primerleri ile

yeniden PCR reaksiyonlarına alınmışlardır. Bu dejenere d-amy primerleri ile *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T, *A. rupiensis* DSM 17127^T, *A. calidus* DSM 25220^T, *A. kaynarcensis* DSM 21706^T, *A. voinovskiensis* DSM 17075^T ve *G. stearothermophilus* DSM 22^T olmak üzere 6 bakteri pozitif reaksiyon vermiştir (Şekil 5.18a ve 5.18b). Dejenere primerle çoğaltılan ürünlerin molekül ağırlıkları bakteriye göre değişmekle birlikte, özellikle *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T, *A. rupiensis* DSM 17127^T ve *A. calidus* DSM 25220^T türlerinde, Chai ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada (18) belirtildiği üzere, tek bir bant ile ifade edilen yaklaşık 800 bç büyüklüğünde bir gen bölgesi çoğaltılabilmiştir. Sonuç olarak, 26 bakteriden sadece diğerlerine kıyasla daha düşük amilolitik aktivite gösteren *B. amyloliquefaciens* DSM 7^T, *A. flavithermus* subp. *yunnanensis* KCTC 13759^T, *A. tepidamans* DSM 16325^T, *A. mongoliensis* DSM 19169^T ve *A. suryakundensis* DSM 27374^T referans türlerinin genleri çoğaltılamamıştır.

Elde edilen PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra çift yönlü dizi analizleri hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonrası ham kromatogramlar incelenerek ileri ve geri primerlerle çoğaltılan gen dizileri Geneious R10 programında bulunan ClustalW uygulamasıyla hizalanmış ve Şekil 5.17'deki amy primeriyle çoğaltılan 15 bakterinin tamamına ve d-amy primeriyle çoğaltılan *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T ve *A. rupiensis* DSM 17127^T referanslarına ait primer dizileri çakıştırılarak her bir gene ait bütünleşik DNA dizileri elde edilebilmiştir. Ancak, amilolitik aktiviteleri düşük olan *A. kaynarcensis* DSM 21706^T, *A. voinovskiensis* DSM 17075^T ve *A. calidus* DSM 25220^T ile farklı bir cinse ait olan *G. stearothermophilus* DSM 22^T referans türünün ise dizi analizleri defalarca tekrarlanmasına rağmen 800 bç'lik bütünleşik bir DNA dizisi elde edilememiştir.

d-amy dejenere primeri ile çoğaltılan *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T ve *A. rupiensis* DSM 17127^T suşlarından sırasıyla elde edilen 888 ve 735 bç'lik amplikonlar dizilenip, BLASTN taraması yapıldığında, her iki bakteriye ait gen dizilerinin *Bacillus stearothermophilus* bscgt, cgt232, cgt5 ve cgt1 genleri olmak üzere en çok *B. stearothermophilus* siklodekstrin glukanotransferaz genlerine benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca, NCBI-korunmuş domain taraması sonucunda, her iki bakteriye ait genin diğer amilaz gen dizilerimizden farklı olarak, maltogenik amilazlar ile siklodekstrin glukanotransferaz enzimlerinde bulunan ve α-amilaz katalitik domaini olan AmyAc_AmyMalt_CGTase_like (cd11320) korunmuş protein domainine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Her iki dizi de siklodekstrin glukanotransferaz enziminin yaklaşık olarak ilk 800 bç'lik upstream kısmına denk gelmektedir. Bu bulgular ışığında, bu kısa

dizilerden ve *Anoxybacillus* sp. B2M1 suşuna ait siklodekstrin glukanotransferaz gen dizisinden (GenBank: CP015435.1) faydalanılarak, yaklaşık 2130 bç'lik genin downstream kısmının da dizilenebilmesi için Primer3web programı (version 4.0) kullanılarak bir cgt primer çifti tasarlanmıştır. *A. caldiproteolyticus* ve *A. rupiensis* bakterilerine ait cgt primeri ile yürütülen PCR reaksiyonları pozitif sonuç vermiş olup, Şekil 5.18c'de sunulmuştur. cgt primeri ile *A. rupiensis'de* yaklaşık 1270 bç'lik, *A. caldiproteolyticus*'ta da yaklaşık 1000 bç'lik PCR ürünleri elde edilmiş ve dizilenmiştir. Elde edilen diziler, önceki 700-900 bç'lik d-amy primer dizileri ile çakıştırıldıklarında ise, *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T suşunun gen dizisinde bir bütünlük sağlanamamış, ancak *A. rupiensis* DSM 17127^T suşunda ilk ve son diziler çakıştığından, *A. rupiensis*'in hedeflenen tüm gen dizisi ortaya çıkarılabilmiştir.



Şekil 5.18. *Anoxybacillus* referans türlerinin *d-amy* **(a ve b)** ve *cgt* **(c)** primerleri kullanılarak elde edilen amilaz süperfamilyasına ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi [NK: Negatif kontrol; M: Marker,Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder; 75-20000 bç; **a.** 1) *Anoxybacillus caldiproteolyticus* DSM 15730^T; 2) *Anoxybacillus rupiensis* DSM 17127^T; 3) *Anoxybacillus calidus* DSM 25220^T, **b.** 1) *Anoxybacillus kaynarcensis* DSM 21706^T; 2) *Anoxybacillus voinovskiensis* DSM 17075^T; 3) *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22 ^{T}, **c.** 1) *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T; 2) *A. rupiensis* DSM 17127^T]

Yeni dizayn edilen primer, amy ve d-amy primerleri ile amplikon oluşturmayan ve kantitatif amilaz aktiviteleri zaten düşük olarak ölçülen *A. tepidamans* DSM 16325^T, *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T, *A. mongoliensis* DSM 19169^T ve *A. suryakundensis* DSM 27374^T referansları ile ayrıca sadece d-amy primeri ile çoğaltılıp, yine düşük amilaz aktivitesi gösteren *A. voinovskiensis* DSM 17075^T, *A. calidus* DSM 25220^T ve *A. kaynarcensis* DSM 21706^T suşlarında da denenmiş, ancak herhangi bir

amplikon elde edilememiştir. Bunun yanı sıra, *A. tepidamans* DSM 16325^T, *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T, *A. mongoliensis* DSM 19169^T ve *A. suryakundensis* DSM 27374^T referans suşlarının amilaz gen dizileri GenBank ve Genomes OnLine veri tabanlarında halihazırda bulunduğundan, bu mevcut diziler de yürütülen filogenetik çalışmalara dahil edilmiştir. Bunun dışında, amy primeri ile çoğaltılamayan *B. amyloliquefaciens* DSM 7^T (NC_014551.1) ve *G. stearothermophilus* DSM 22^T (M57457.1) dış grup referanslarının amilaz gen dizileri de halihazırda GenBank'ta mevcuttur.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, *Anoxybacillus* cinsine ait 6 izolatımız da dahil olmak üzere amilolitik aktivite gösteren toplam 15 farklı bakteri türünün α-amilaz genlerinin ve *A. rupiensis* DSM 17127^T suşunun siklodekstrin glukanotransferaz geninin tam dizileri elde edilebilmiş, ayrıca *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T suşunun siklodekstrin glukanotransferaz geni de kısmi olarak ortaya çıkarılabilmiştir.

5.6.2. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ GENLERİNİN ANNOTASYONU VE GENBANK AKSESYON NUMARALARININ TEMİNİ

GenBank'tan aksesyon numarası talebi öncesi genin korunmuş bölgelerinin CDS (korunmuş domain araması) annotasyonu istenildiğinden, dizilenen α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz genlerinin kısmi olarak işlevleri belirlenmiştir. Bunun için öncelikle, NCBI-BLASTN/BLASTP programları yardımıyla kendi dizilerimiz ile GenBank veri tabanında mevcut referans suşlara ait α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz enzimlerini kodlayan gen/amino asit dizileri karşılaştırılarak aralarındaki gen/amino asit dizisi benzerlik oranları belirlenmiştir. Ayrıca, NCBI-CDS programı kullanılarak, elde edilen olası amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz proteinlerinin amino asit dizilerinde; alfa-amilaz süperfamilyasına ait korunmuş dizilerin mevcudiyeti, en çok hangi α-amilaz familyasına ait enzim(ler)e benzerlik gösterdikleri ve enzimlerin aktif/katalitik bölgeleri belirlenmiştir.

NCBI-korunmuş domain arama programı ile yürütülen çalışmada, 17 genin de glikozid hidrolazların en büyük familyası olan α-amilaz enzim familyasına (GH13) [***AmyAc_family Superfamily*** (cl07893)] dahil oldukları belirlenmiştir. Bunlardan amy primeri ile çoğaltılarak dizilemesi yapılan ve Çizelge 5.15'te sunulan ilk 15 *Anoxybacillus* gen

dizisinde, bakteriyel siklomaltodekstinazlar ve ilgili proteinlerde bulunan alfa amilaz katalitik domaini olarak tanımlanan ***AmyAc-bac-CMD-like-2*** (cd11339) korunmuş protein domainin yer aldığı görülmüştür. α-Amilaz (EC 3.2.1.1) enzimini kodlayan bu 15 genin katalitik üçlü yapı olarak korunmuş aspartat, glutamat ve aspartat amino asit kökleri (Asp213, Glu242 ve Asp310), 2 korunmuş histidin kökü (His140 ve His309) ve Ca^{+2} iyonunun bağlanmasından sorumlu 3 amino asit kökü (Asn139, Asp182 ve His217) içerdiği görülmüştür (amino asit pozisyonları E184aa α-amilaz dizisine göre numaralandırılmıştır).

d-amy ve cgt primerleri ile çoğaltılarak dizilemesi yapılan *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T ve *A. rupiensis* DSM 17127^T referans türlerine ait gen dizilerinin ise yine aynı süperfamilyaya dahil oldukları ve dizilerde maltojenik amilazlar, siklodekstrin glukanotransferaz ve ilgili proteinlerde bulunan alfa amilaz katalitik domaini olarak tanımlanan ***AmyAc-AmyMalt-CGTase-like*** (cd11320) korunmuş protein domainin yer aldığı görülmüştür. Siklodekstrin glukanotransferaz (EC 2.4.1.19) enzimini kodlayan bu iki genin de katalitik üçlü yapı olarak korunmuş aspartat, glutamat ve aspartat amino asit kökleri (Asp256, Glu284 ve Asp355), 2 korunmuş histidin kökü (His167 ve His354), Ca^{+2} iyonunun bağlanmasından sorumlu 5 amino asit kökü (Asp55, Asn60, Asp81, Asn166 ve Asp226), MBS1 (Trp640, Lys675, Trp687, Glu688 ve Asn692) ve MBS2 (Thr622, Asn623, Gly625, Asn627, Asn651, Gln652, Tyr657 ve Trp660) olmak üzere 2 maltoz bağlanma bölgesi içerdiği gözlenmiştir (amino asit pozisyonları *A. rupiensis* DSM 17127^T CGTaz dizisine göre numaralandırılmıştır) (Çizelge 5.15). Bunların dışında, α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz gen dizilerinin GenBank veri tabanındaki referans suşlara ait amilaz ve CGTaz enzimini kodlayan dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki gen dizisi benzerlik oranlarının belirlendiği NCBI-nucleotide BLAST tarama sonuçları ile bu enzim proteinlerinin standart genetik koda göre belirlenmiş olası amino asit dizilerinde yapılmış olan korunmuş domain tarama sonuçları, sırasıyla Çizelge 5.16 ve 5.17'de detaylı bir şekilde sunulmuştur.

NCBI-BLASTN tarama sonuçlarına göre, 15 α-amilaz geni *Anoxybacillus* cinsi bakterilerden izole edilen α-amilaz genlerine en çok % 91.0-99.0 oranları arasında, "0" E-değeri ile güvenilir sınırlarda benzerlik göstermiştir. Çizelge 5.16 ve 5.17'de sadece % 91.0 ve üzerindeki en yüksek dizi benzerlik oranları sunulmuştur. Farklı bir cinsin veya tanımlanmamış izolatların genleriyle benzerlik oranları % 90'ın altında olup, bu durumda E-değerinin güvenilirliği oldukça azalmıştır. Tüm *Anoxybacillus* izolatları (A321, A3120,

D222b, E184aa, E184ab ve E208a) ile *A. salavatliensis* DSM 22626^T, *A. gonensis* NCIMB 13933^T, *A. amylolyticus* DSM 15939^T ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T referans bakterilerine ait amilaz genlerinin en çok *Anoxybacillus* sp. DT3-1 α-amilaz genine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *A. ayderensis* NCIMB 13972^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T ve *A. thermarum* DSM 17141^T referanslarının amilaz genleri en fazla *A. gonensis* G2 suşunun tüm genom dizisine; *A. flavithermus* DSM 2641^T ve *A. kestanbolensis* NCIMB 13971^T referanslarının amilaz genleri ise *A. flavithermus* WK1 tüm genomundan sonra en fazla *Anoxybacillus* sp. SK3-4 α-amilaz genine benzerlik göstermiştir. Ayrıca, DSM 15730^T ve DSM 17127^T siklodekstrin glukanotransferazları da en çok *Anoxybacillus* sp. B7M1 (CP015436.1:c859160-857025) ve B2M1 (CP015435.1:784808-786943) ile *B. stearothermophilus* cgt232 (X59044.1) ve *B. stearothermophilus* bscgt (U83799.1) genlerine % 85.0-99.0 oranlarında benzerlik göstermişlerdir.

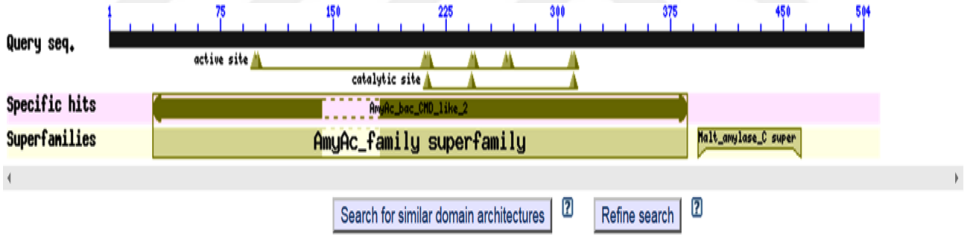
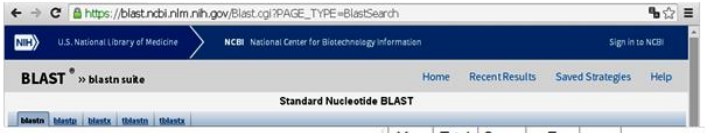
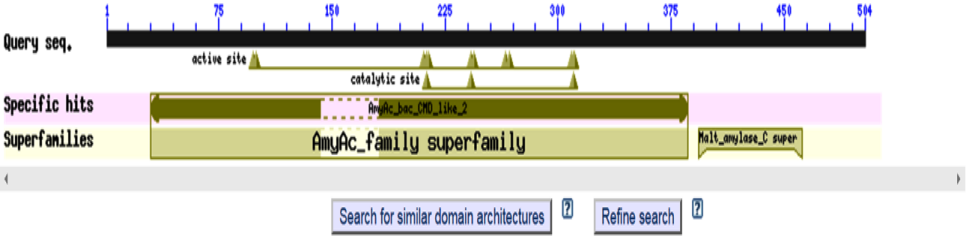
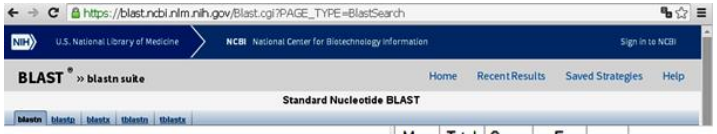
Çizelge 5.15. Dizilenen genlerin NCBI-CDS programı kullanılarak elde edilen yapısal analizlerine ait bulgular ve gruplandırıldıkları enzim sınıfları

Süperfamilya: Glikozid Hidrolaz Familyası 13 (AmyAc_family) (cl07893)						
AmyAc-bac-CMD-like-2 (cd11339), α-amilaz (EC 3.2.1.1)						
amy primeriyle çoğalanlar	**Katalitik üçlü (Aktif bölge)**	**Bulunduğu sekonder yapı**	**Ca^{+2} bağlanma bölgesi**	**Bulunduğu sekonder yapı**	**Fonksiyonel histidin kökleri**	**Bulunduğu sekonder yapı**
E208a, E184aa, E184ab, D222b, A3210, A321, DSM 22626^T, NCIMB 13933^T, NCIMB 13972^T, NCIMB 13971^T, DSM 14988^T, DSM 2641^T, DSM 15939^T, DSM 17141^T, DSM 18475^T	D213	β4 iplikçiği (CSR-II)	N139	β3 iplikçiği (CSR-I)	H140	β3 iplikçiği (CSR-I)
	E242	β5 iplikçiği (CSR-III)	D182	loop 3 (CSR-V)	H309	β7 iplikçiği (CSR-IV)
	D310	β7 iplikçiği (CSR-IV)	H217	β4 iplikçiği (CSR-II)		
	Değişmeyen amino asit kökü: R211 (β4 iplikçiği, CSR-II)					

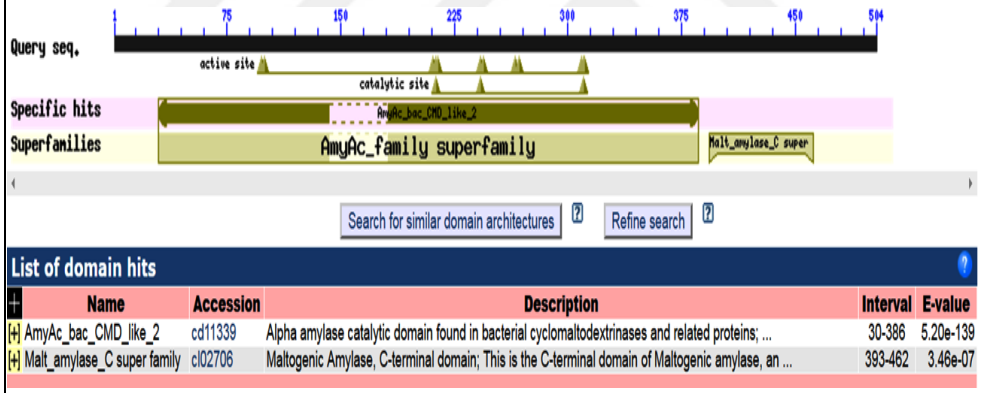
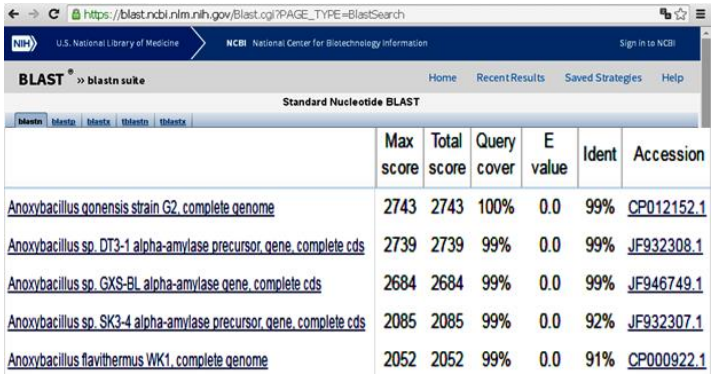
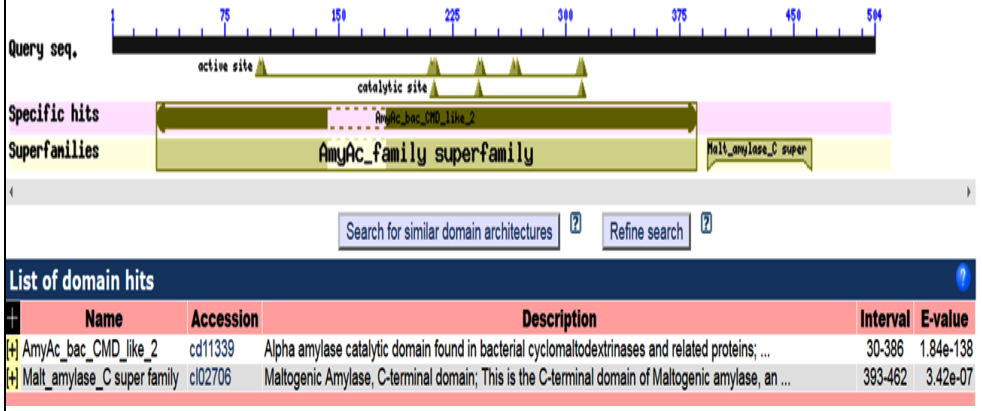
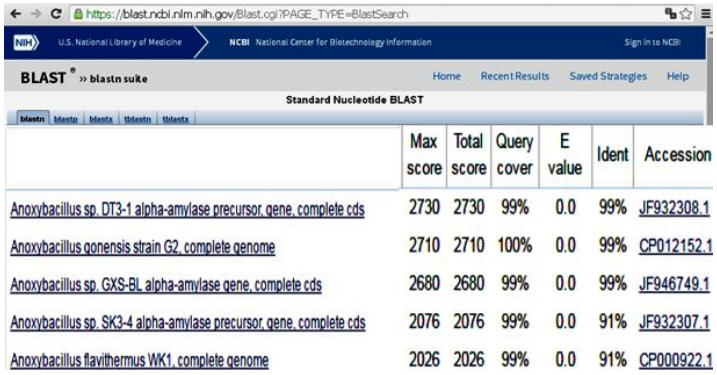
AmyAc-AmyMalt-CGTase-like (cd11320), siklodekstrin glukanotransferaz (EC 2.4.1.19)									
d-amy ve cgt primeriyle çoğalanlar	**Katalitik üçlü (Aktif bölge)**	**Bulunduğu sekonder yapı**	**Ca^{+2} bağlanma bölgesi**	**Bulunduğu sekonder yapı**	**Maltoz bağlanma bölgeleri**		**Bulunduğu sekonder yapı**	**Fonksiyonel histidin kökleri**	**Bulunduğu sekonder yapı**
					MBS1	**MBS2**			
DSM 15730^T, DSM 17127^T	D256	β4 iplikçiği (CSR-II)	D55 N60 D81	A domainin β1 iplikçiği ve α1 heliksi ile bağlantılı loop bölgesi	W640 K675 W687 E688 N692	T622 N623 G625 N627 N651 Q652 Y657 W660	E domaini	H167	β3 iplikçiği (CSR-I)
			N166	β3 iplikçiği (CSR-I)				H354	β7 iplikçiği (CSR-IV)
	E284	β5 iplikçiği (CSR-III)	D226	loop 3 (CSR-V)					
	D355	β7 iplikçiği (CSR-IV)							
	Değişmeyen amino asit kökü: R254 (β4 iplikçiği, CSR-II)								

Amino asit pozisyonları; α-amilazlar için E184aa, siklodekstrin glukanotransferazlar için ise DSM 17127^T'ye göre numaralandırılmıştır. **Kısaltmalar:** DSM 22626: *A. salavatliensis*; NCIMB 13933: *A. gonensis*; NCIMB 13972: *A. ayderensis*; NCIMB 13971: *A. kestanbolensis*; DSM 14988: *A. kamchatkensis*; DSM 2641: *A. flavithermus*; DSM 15939: *A. amylolyticus*; DSM 17141: *A. thermarum*; DSM 18475: *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*; DSM 15730: *A. caldiproteolyticus*; DSM 17127: *A. rupiensis*; CSR: Korunmuş dizi bölgesi (conserved sequence region); MBS1, MBS2: Maltoz bağlanma bölgesi-1 ve 2; Amino asitler: D (Asp-Aspartik asit), E (Glu-Glutamik asit), G (Gly-Glisin), H (His-Histidin), K (Lys-Lizin), N (Asn-Asparajin), Q (Gln-Glutamin), R (Arg-Arginin), T (Thr-Treonin), W (Trp-Triptofan), Y (Tyr-Tirozin).

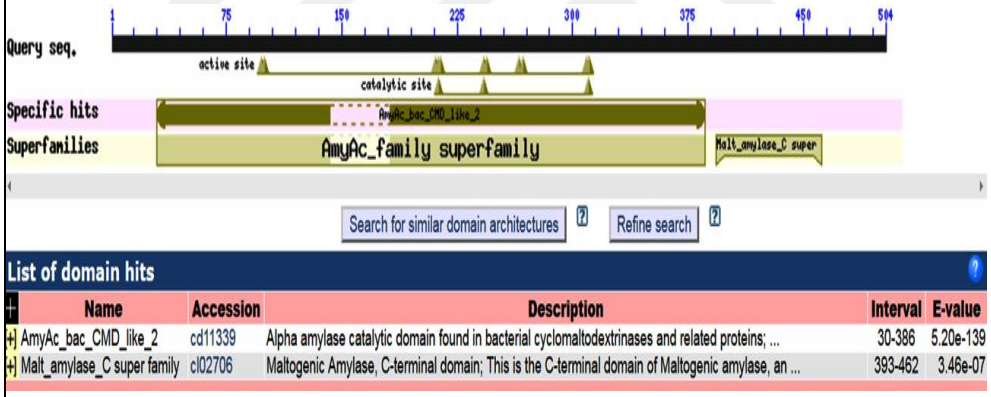
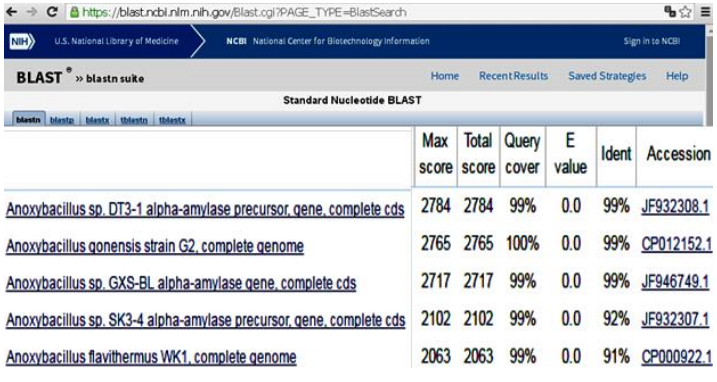
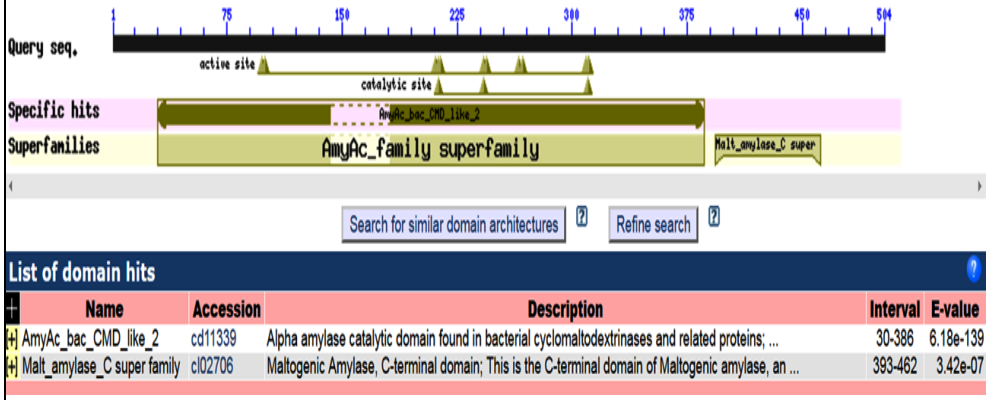
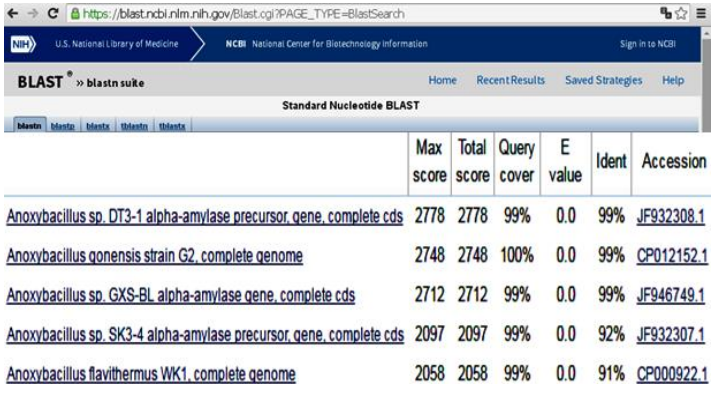
Çizelge 5.16. Dizilenen α-amilaz genleri ile ilişkilendirilmiş korunmuş domainler ve GenBank veri tabanında en çok benzerlik gösterdikleri referans suşların gen dizileri ile aralarındaki benzerlik oranları

Bakteri	NCBI-Korunmuş Domain tarama sonucu	NCBI-nucleotide BLAST tarama sonucu
E208a		 Max score / Total score / Query cover / E value / Ident / Accession Anoxybacillus sp. DT3-1 alpha-amylase precursor, gene, complete cds 2745 2745 99% 0.0 99% JF932308.1 Anoxybacillus gonensis strain G2, complete genome 2737 2737 100% 0.0 99% CP012152.1 Anoxybacillus sp. GXS-BL alpha-amylase gene, complete cds 2689 2689 99% 0.0 99% JF946749.1 Anoxybacillus sp. SK3-4 alpha-amylase precursor, gene, complete cds 2091 2091 99% 0.0 92% JF932307.1 Anoxybacillus flavithermus WK1, complete genome 2058 2058 99% 0.0 91% CP000922.1
E184aa		 Max score / Total score / Query cover / E value / Ident / Accession Anoxybacillus gonensis strain G2, complete genome 2737 2737 100% 0.0 99% CP012152.1 Anoxybacillus sp. DT3-1 alpha-amylase precursor, gene, complete cds 2734 2734 99% 0.0 99% JF932308.1 Anoxybacillus sp. GXS-BL alpha-amylase gene, complete cds 2678 2678 99% 0.0 99% JF946749.1 Anoxybacillus sp. SK3-4 alpha-amylase precursor, gene, complete cds 2080 2080 99% 0.0 91% JF932307.1 Anoxybacillus flavithermus WK1, complete genome 2047 2047 99% 0.0 91% CP000922.1

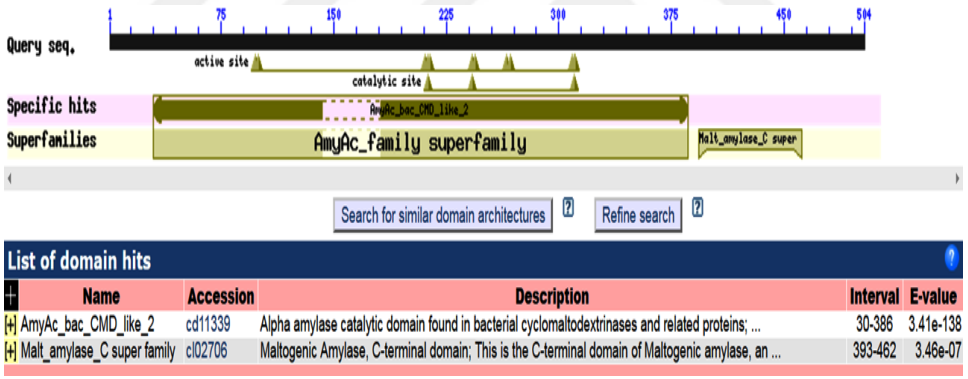
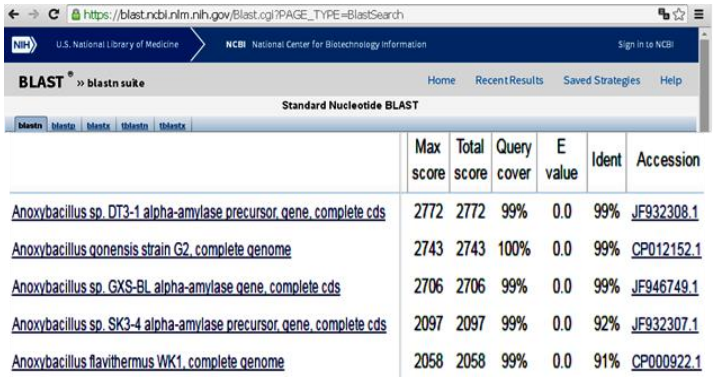
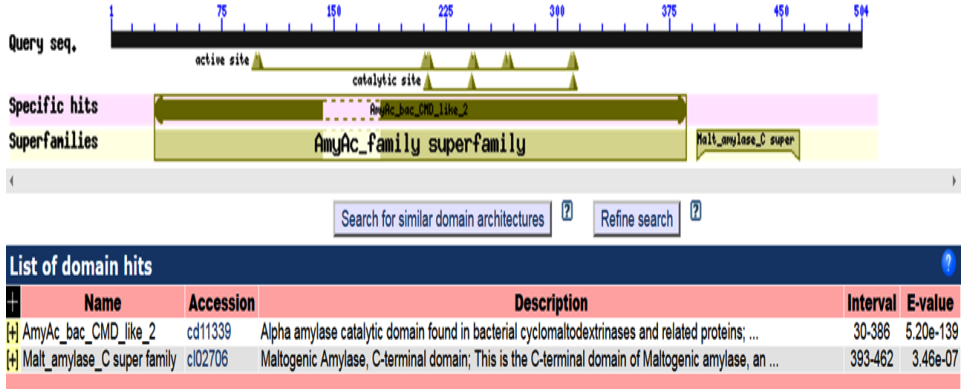
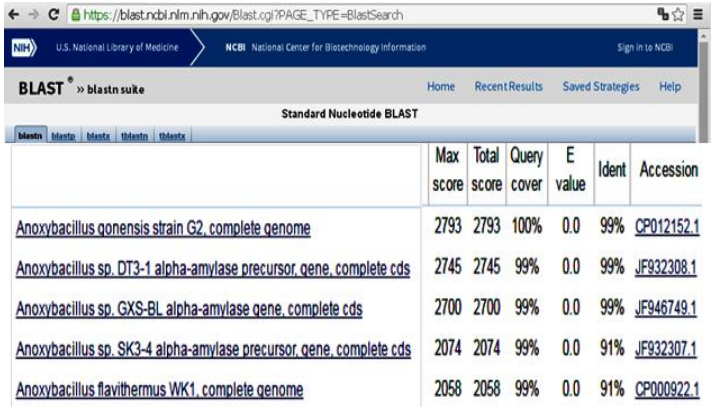
Çizelge 5.16. (devam)

Bakteri	NCBI-Korunmuş Domain tarama sonucu	NCBI-nucleotide BLAST tarama sonucu
E184ab		
D222b		

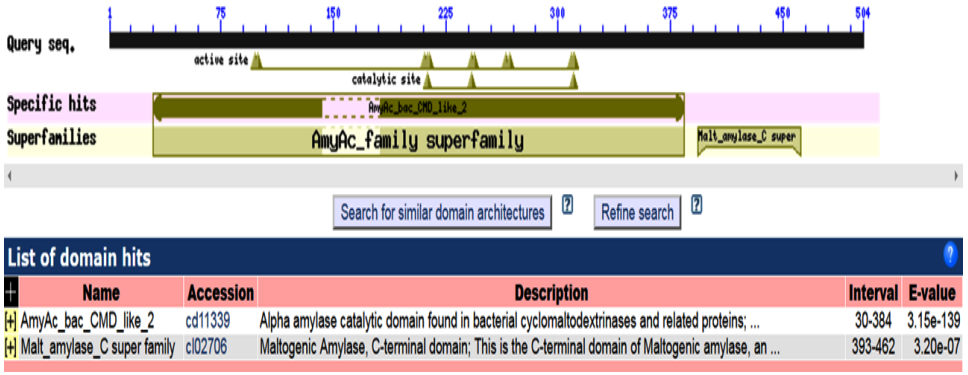
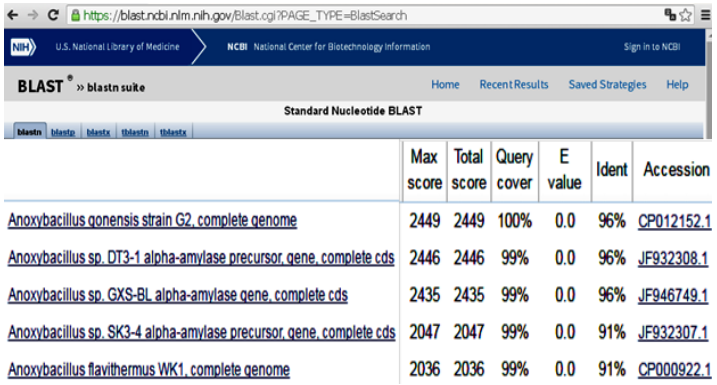
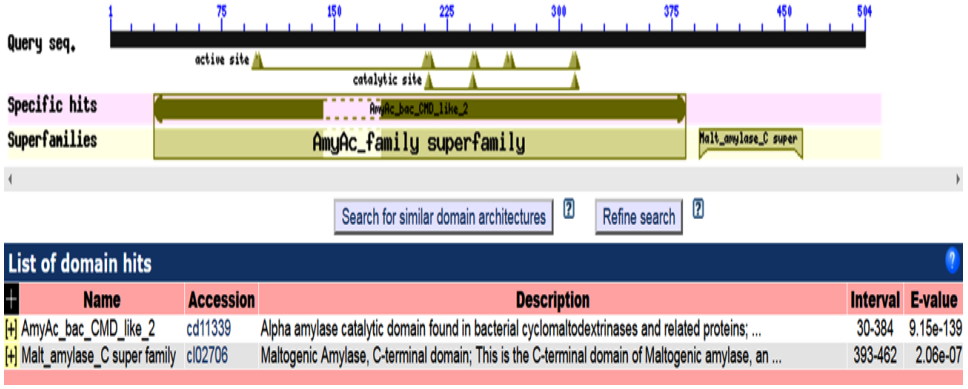
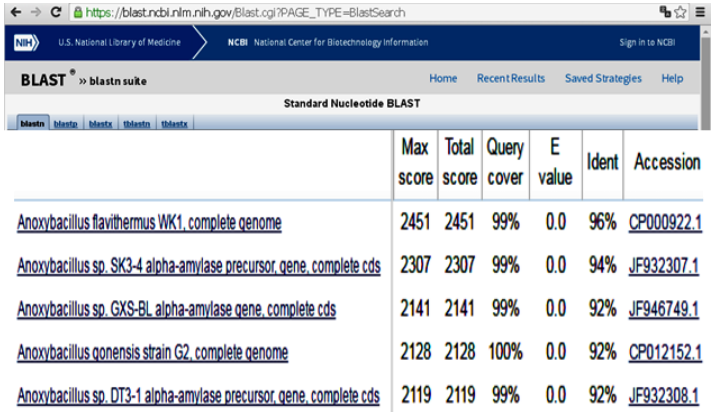
Çizelge 5.16. (devam)

Bakteri	NCBI-Korunmuş Domain tarama sonucu	NCBI-nucleotide BLAST tarama sonucu
A3210		
A321		

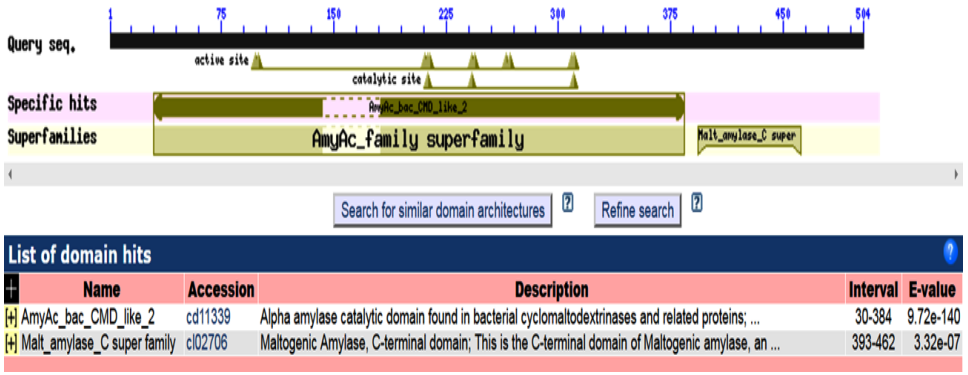
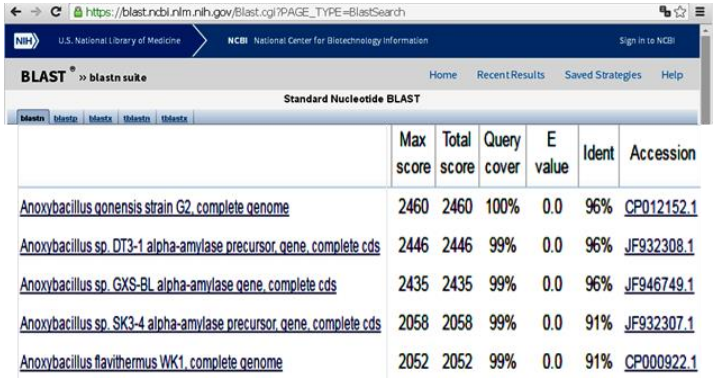
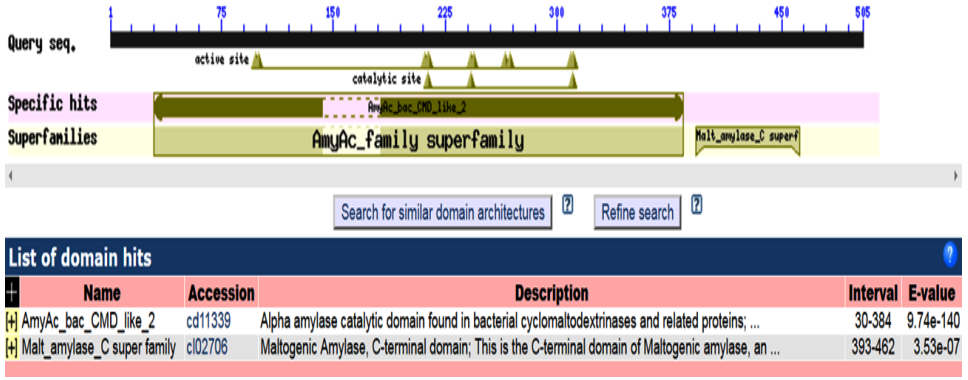
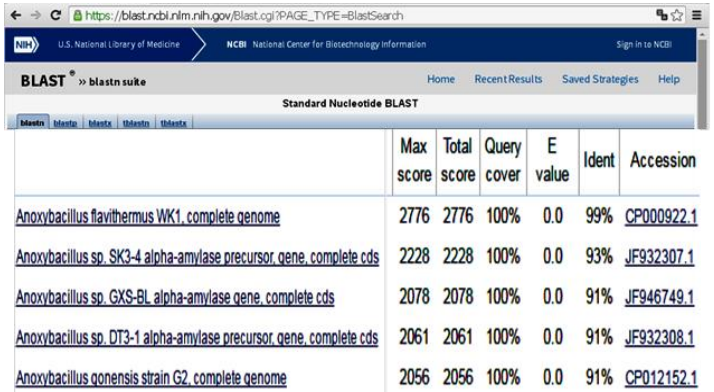
Çizelge 5.16. (devam)

Bakteri	NCBI-Korunmuş Domain tarama sonucu	NCBI-nucleotide BLAST tarama sonucu
A. salavatliensis DSM 22626^{T}		
A. gonensis NCIMB 13933^{T}		

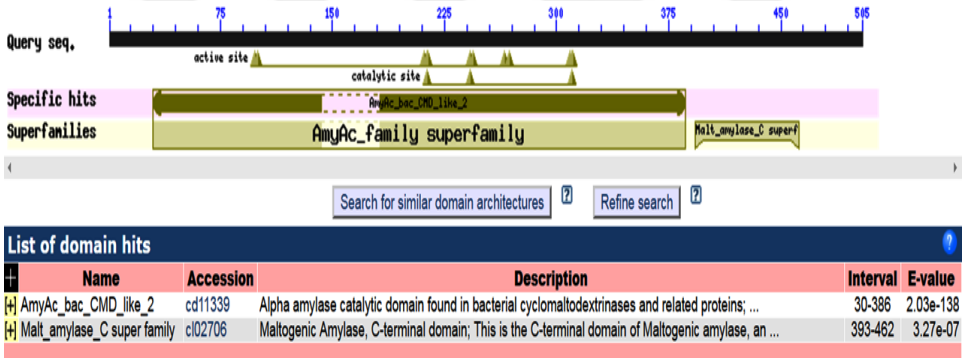
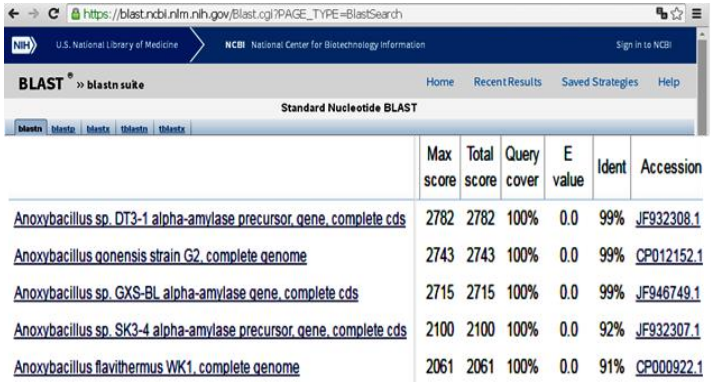
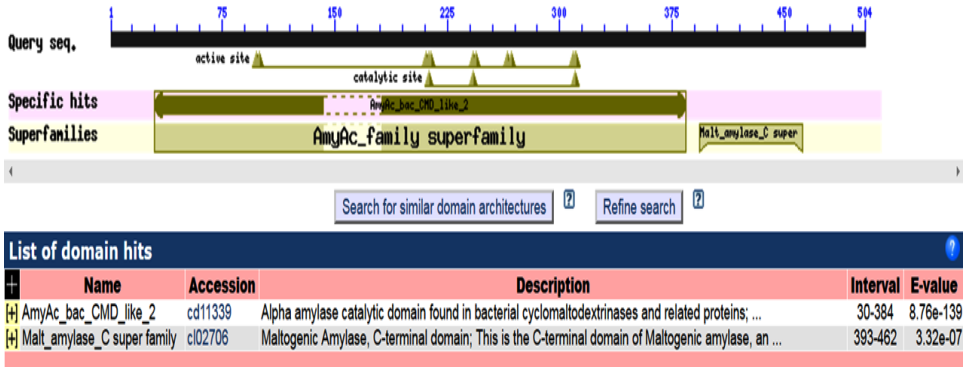
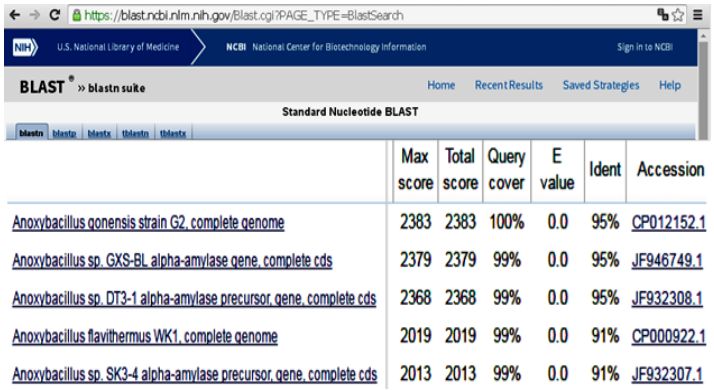
Çizelge 5.16. (devam)

Bakteri	NCBI-Korunmuş Domain tarama sonucu	NCBI-nucleotide BLAST tarama sonucu
A. aydeensis NCIMB 13972^{T}		
A. kestanbolensis NCIMB 13971^{T}		

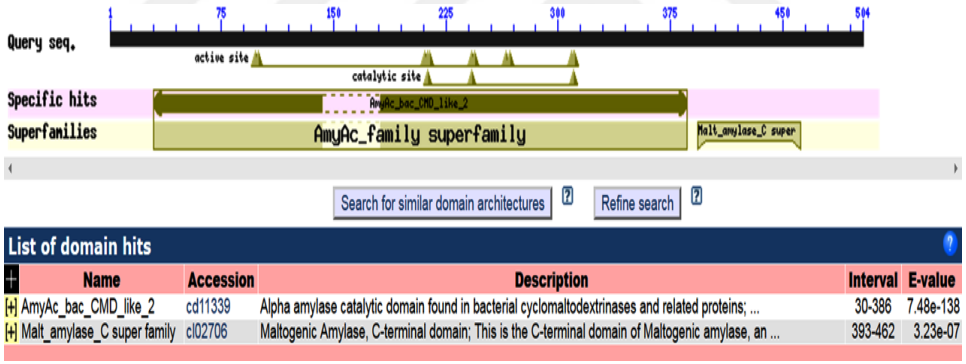
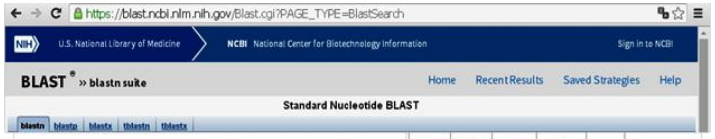
Çizelge 5.16. (devam)

Bakteri	NCBI-Korunmuş Domain tarama sonucu	NCBI-nucleotide BLAST tarama sonucu
A. kamchatkensis DSM 14988^{T}		
A. flavithermus DSM 2641^{T}		

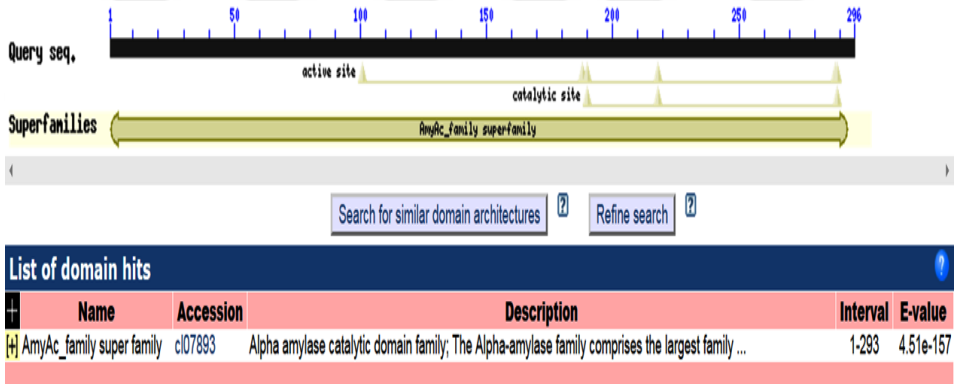
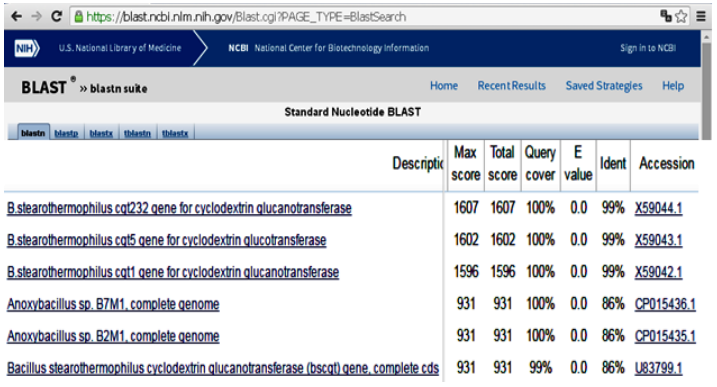
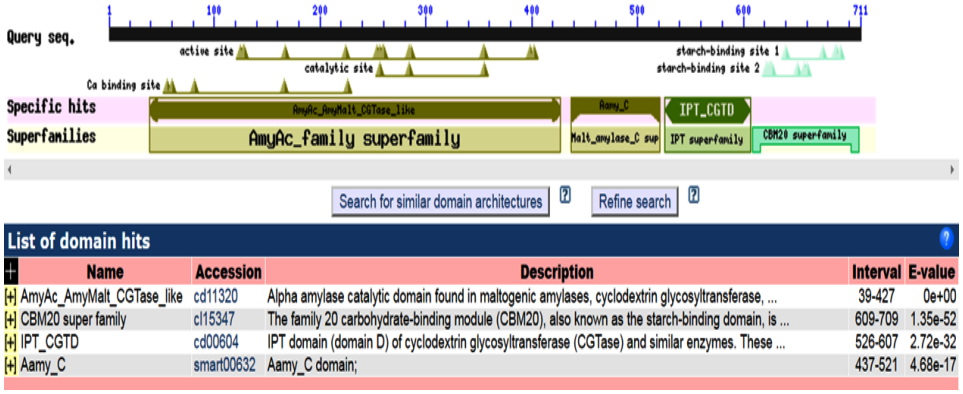
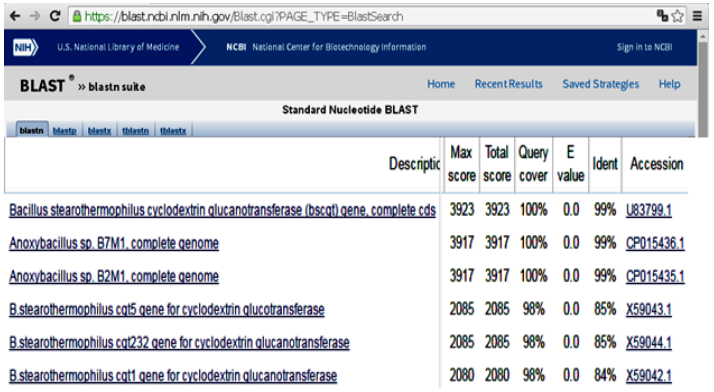
Çizelge 5.16. (devam)

Bakteri	NCBI-Korunmuş Domain tarama sonucu	NCBI-nucleotide BLAST tarama sonucu
A. amylolyticus DSM 15939^{T}		
A. thermarum DSM 17141^{T}		

Çizelge 5.16. (devam)

Bakteri	NCBI-Korunmuş Domain tarama sonucu	NCBI-nucleotide BLAST tarama sonucu
A. kamchatkensis subsp. *asaccharedens* DSM 18475^{T}	 Name | Accession | Description | Interval | E-value [+] AmyAc_bac_CMD_like_2 | cd11339 | Alpha amylase catalytic domain found in bacterial cyclomaltodextrinases and related proteins; ... | 30-386 | 7.48e-138 [+] Malt_amylase_C super family | cl02706 | Maltogenic Amylase, C-terminal domain; This is the C-terminal domain of Maltogenic amylase, an ... | 393-462 | 3.23e-07	 Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession Anoxybacillus sp. DT3-1 alpha-amylase precursor, gene, complete cds | 2734 | 2734 | 99% | 0.0 | 99% | JF932308.1 Anoxybacillus gonensis strain G2, complete genome | 2715 | 2715 | 100% | 0.0 | 99% | CP012152.1 Anoxybacillus sp. GXS-BL alpha-amylase gene, complete cds | 2684 | 2684 | 99% | 0.0 | 99% | JF946749.1 Anoxybacillus sp. SK3-4 alpha-amylase precursor, gene, complete cds | 2074 | 2074 | 99% | 0.0 | 91% | JF932307.1 Anoxybacillus flavithermus WK1, complete genome | 2025 | 2025 | 99% | 0.0 | 91% | CP000922.1

Çizelge 5.17. Dizilenen siklodekstrin glukanotransferaz genleri ile ilişkilendirilmiş korunmuş domainler ve GenBank veri tabanında en çok benzerlik gösterdikleri referans suşların gen dizileri ile aralarındaki benzerlik oranları

Bakteri	NCBI-Korunmuş Domain tarama sonucu	NCBI-nucleotide BLAST tarama sonucu
A. caldiproteolyticus DSM 15730^T		
A. rupiensis DSM 17127^T		

5.6.3. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ GEN DİZİLERİNİN GENBANK AKSESYON NUMARALARI

Anoxybacillus cinsine dahil bakterilerden elde edilen nihai gen dizileri ve ilişkili işlev analizleri neticesinde, GenBank veri tabanına (NCBI-Banklt) başvurularak her bir dizi için aksesyon numarası alınmıştır. Buna göre, tez çalışması kapsamında dizilenerek, açık okuma çerçevelerinin saptanması sonrası işlev analizleri yapılan 17 genin uzunluğu ve alınan GenBank aksesyon numaraları Çizelge 5.18'de sunulmuştur. Bu dizilerden sadece *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^{T}'a ait siklodekstrin glukanotransferaz geni kısmi olarak dizilenmiş, diğer 16 genin tüm gen dizisi çıkarılabilmiştir.

Çizelge 5.18. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz gen dizilerinin uzunlukları ve GenBank aksesyon numaraları

İzolat Kodu/Tür Adı	**Gen adı**	**GenBank Aksesyon Numarası**		**Gen dizi uzunluğu (bç)**
		Gen ID	**Protein ID**	
E184aa	α-amilaz	KY426431	AQU15044.1	1515
E208a	α-amilaz	KY426432	AQU15045.1	1515
E184ab	α-amilaz	KY426433	AQU15046.1	1515
D222b	α-amilaz	KY426434	AQU15047.1	1515
A3210	α-amilaz	KY426435	AQU15048.1	1515
A321	α-amilaz	KY426436	AQU15049.1	1515
***A. salavatliensis* DSM 22626^{T}**	α-amilaz	KY426437	AQU15050.1	1515
***A. gonensis* NCIMB 13933^{T}**	α-amilaz	KY426438	AQU15051.1	1515
***A. ayderensis* NCIMB 13972^{T}**	α-amilaz	KY426439	AQU15052.1	1515
***A. kestanbolensis* NCIMB 13971^{T}**	α-amilaz	KY426440	AQU15053.1	1515
***A. kamchatkensis* DSM 14988^{T}**	α-amilaz	KY426441	AQU15054.1	1515
***A. flavithermus* DSM 2641^{T}**	α-amilaz	KY426442	AQU15055.1	1518
***A. amylolyticus* DSM 15939^{T}**	α-amilaz	KY426443	AQU15056.1	1518
***A. thermarum* DSM 17141^{T}**	α-amilaz	KY426444	AQU15057.1	1515
***A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^{T}**	α-amilaz	KY426445	AQU15058.1	1515
***A. caldiproteolyticus* DSM 15730^{T}**	siklodekstrin glukanotransferaz	KY426446	AQU15059.1	888
***A. rupiensis* DSM 17127^{T}**	siklodekstrin glukanotransferaz	KY426447	AQU15060.1	2136

5.6.4. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ AMİNO ASİT DİZİLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZLERİ

NCBI-BLASTP programı yardımıyla GenBank veri tabanında *Anoxybacillus* cinsine dahil mevcut referans suşlara ait tüm α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz protein dizileri saptanmıştır. GenBank ve Genomes OnLine veri tabanlarında şu anda 27 *Anoxybacillus*

cinsi bakterinin genom dizisi (4'ünün tüm genom dizisi, 23'ünün taslak genom dizisi) bulunmaktadır. Bu veri tabanlarındaki α-amilaz gen dizilerinden 10'u *Anoxybacillus* spp. izolatlarına (DT3-1, SK3-4, GXS-BL, BCO1, KU2-6, P3H1B, B2M1, B7M1, UARK-01 ve 103), 13'ü ise tanımlanmış türlere (*A. flavithermus* DSM 2641, *A. pushchinoensis* K1, *A. gonensis* G2, *A. suryakundensis* DSM 27374, *A. thermarum* AF/04, *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13, *A. ayderensis* NCIMB 13972, *A. tepidamans* PS2, *A. geothermalis* ATCC BAA 2555, *A. amylolyticus* DSM 15939, *A. kamchatkensis* G10, *A. mongoliensis* MB4 ve *A. vitaminiphilus* CGMCC 1.8979) aittir. Uluslararası veritabanlarında mevcut olan ve tez çalışması ile ilişkili tüm *Anoxybacillus* cinsi ve/veya onunla ilişkili bakterilere ait GH13 familyasına dahil α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz gen/amino asit dizileri ile ilgili bilgiler Çizelge 5.19'da sunulmuştur. Filogenetik analizlerde, 15 α-amilaz ve 2 siklodekstrin glukanotransferaz olmak üzere toplam 17 protein dizisi dışında, NCBI-BLASTP taraması sonucunda bu dizilere en çok benzerlik gösterdiği belirlenen ilgili veri tabanlarındaki 13'ü *Anoxybacillus* cinsine ve 2'si *B. stearothermophilus* türlerine ait olmak üzere toplam 15 protein dizisi ile *Anoxybacillus* türlerine ait 3 dış grup protein dizisi (trehaloz-6-fosfat hidrolaz, siklomaltodekstrinaz ve pullulanaz) çalışmaya dahil edilmiştir (Çizelge 5.19). Böylece, tez kapsamında dizilenemeyen ve mevcut veri tabanlarında α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz protein dizisi bulunmayan *A. kaynarcensis* DSM 21706^T, *A. voinovskiensis* DSM 17075^T ve *A. calidus* DSM 25220^T ile yine veri tabanlarında ilgili protein dizileri bulunmayan 5 tip suş (*A. contaminans* DSM 15866^T, *A. bogrovensis* DSM17956^T, *A. tengchongensis* DSM 23211^T, *A. eryuanensis* DSM 23212^T ve *A. vitaminiphilus* JCM 16594^T) dışında, toplam 23 tür ve 3 alt tür içeren *Anoxybacillus* cinsinin tip suşundan 17 tanesi ile tez kapsamında elde edilen olası protein dizilerine benzerlik gösteren 7 *Anoxybacillus* spp. izolatlarının (DT3-1, SK3-4, GXS-BL, BCO1, KU2-6, P3H1B ve B2M1) genleri, filogenetik analizlere dahil edilerek tüm cinsi kapsayan geniş bir perspektifte birarada incelenmiştir. Buna göre, *Anoxybacillus* cinsi basillere ait 27 α-amilaz ile 5 siklodekstrin glukanotransferaz (2'si *B. stearothermophilus* türüne, 3'ü *Anoxybacillus* suşlarına ait) olmak üzere toplam 32 protein dizisi ile *Anoxybacillus* türlerine ait 3 dış grubun protein dizisi kullanılarak yürütülen filogenetik analizlerden elde edilen evrimsel uzaklık matriksi Çizelge 5.20'de verilmiştir. Geneious programında 1000 bootstrap numunelemesi ile evrimsel uzaklığı gösteren Jukes-Cantor modeli kullanılarak, Neighbour-joining metoduna göre oluşturulmuş olan filogenetik ağaç ise Şekil 5.19'da verilmiştir.

Çizelge 5.19. Filogenetik analizlerde kullanılan ve NCBI-BLASTP taraması sonucunda dizilerimize en çok benzerlik gösterdiği belirlenen *Anoxybacillus* cinsi veya onunla ilişkili bakterilere ait GH13 familyasına dahil α-amilaz, siklodekstrin glukanotransferaz ile 3 dış grup gen/amino asit dizilerine dair bilgiler (┼: bu tez kapsamında elde edilen diziler; aa: olası proteinin toplam amino asit sayısı)

Bakteri	Kültür koleksiyon numarası/İzolat adı	GenBank Aksesyon Numarası		Amino asit sayısı (aa)
		Gene ID	Protein ID	
EC 3.2.1.1: α-AMİLAZLAR (Amy)				
***Anoxybacillus* sp.**	E184aa	KY426431 ┼	AQU15044.1	504
***Anoxybacillus* sp.**	E208a	KY426432 ┼	AQU15045.1	504
***Anoxybacillus* sp.**	E184ab	KY426433 ┼	AQU15046.1	504
***Anoxybacillus* sp.**	D222b	KY426434 ┼	AQU15047.1	504
***Anoxybacillus* sp.**	A3210	KY426435 ┼	AQU15048.1	504
***Anoxybacillus* sp.**	A321	KY426436 ┼	AQU15049.1	504
A. salavatliensis	DSM22626^T/ A343	KY426437 ┼	AQU15050.1	504
A. gonensis	NCIMB 13933^T/ G2	KY426438 ┼	AQU15051.1	504
	NCIMB 13933^T/ G2	CP012152.1:574939-576453	WP_035064852.1	504
A. ayderensis	NCIMB 13972^T/ AB04	KY426439 ┼	AQU15052.1	504
	NCIMB 13972^T/ AB04	NZ_JXTG01000003.1:c90174-91688	WP_042534511.1	504
A. kestanbolensis	NCIMB 13971^T/ K4	KY426440 ┼	AQU15053.1	504
A. kamchatkensis	DSM 14988^T/ JW/VK-KG4y	KY426441 ┼	AQU15054.1	504
	G10	NZ_ALJT01000024.1:c83877-85391	WP_019417912.1	504
A. flavithermus	DSM 2641^T	KY426442 ┼	AQU15055.1	505
	DSM 2641^T/ WK1	NC_011567.1:c2164655-2166172	WP_012575725.1	505
	NBRC 109594	NZ_BARH01000004.1:c75975-77492	WP_006318967.1	505
	AF16	NZ_LUCQ01000090.1:97682-99196	WP_064214229.1	504
	TNO-09.006	NZ_KB205935.1:c2094644-2096158	WP_004891960.1	504
	AK1	NZ_APCD01000003.1:c103504-105021	WP_003395485.1	505
	AF14	NZ_LUFB01000142.1:c13593-15107	WP_004891960.1	504
A. flavithermus* subsp. *yunnanensis	KCTC 13759^T/ E13	NZ_KN127221.1:c47860-49374	WP_032100815.1	504
A. amylolyticus	DSM 15939^T/ MR3C	KY426443 ┼	AQU15056.1	505
	DSM 15939^T/ MR3C	NZ_CP015438.1:1034286-1035758	ANB61731.1	508
A. thermarum	DSM 17141^T/ AF/04	KY426444 ┼	AQU15057.1	504
	DSM 17141^T/ AF/04	NZ_JXTH01000002.1:10312-11826	WP_043963774.1	504
A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens	DSM 18475^T/ KG8	KY426445 ┼	AQU15058.1	504
***Anoxybacillus* sp.**	GXS-BL	JF946749.1	AEQ38578.1	505
***Anoxybacillus* sp.**	DT3-1	JF932308.1	AFI49456.1	505
***Anoxybacillus* sp.**	SK3-4	JF932307.1	AFI49455.1	505
A. tepidamans	PS2	NZ_JHVN01000005.1:c124684-126216	WP_027408973.1	510
A. suryakundensis	DSM 27374^T/ JS1	NZ_CYGZ01000003.1:131735-133249	WP_055440502.1	504
A. pushchinoensis	DSM 12423^T/ K1	FOJQ01000016.1:15625-17142	SFA47738.1	505
***Anoxybacillus* sp.**	KU2-6(11)	NZ_JPZN01000005.1:26075-27589	WP_035046219.1	504
***Anoxybacillus* sp.**	P3H1B	NZ_LPUG01000012.1:203512-205044	WP_066148217.1	510
A. geothermalis	ATCC BAA-2555^T/ GSSed3	NZ_JYCG01000312.1:c4837-6372	WP_044746216.1	511
A. mongoliensis	MB4	NZ_MRZM01000007.1:20882-22396	WP_075039288.1	504
***Anoxybacillus* sp.**	BCO1	JRLC01000004.1:24870-26120	KHF30424.1 (Beta/alfa-amilaz)	416
EC 2.4.1.19: SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZLAR (CGTaz)				
A. caldiproteolyticus	DSM 15730^T/ SF03	KY426446 ┼	AQU15059.1	296
A. rupiensis	DSM 17127^T/ R270	KY426447 ┼	AQU15060.1	711
***Anoxybacillus* sp.**	B7M1	CP015436.1:c857025-859160	ANB65966.1	711
***Anoxybacillus* sp.**	B2M1	CP015435.1:784808-786943	ANB55730.1	711
***B. stearothermophilus* (cgt232)**	NO2	X59044.1	CAA41772.1	711
***B. stearothermophilus* (bscgt)**	ET1	U83799.1	AAD00555.1	711
EC 3.2.1.54: SİKLOMALTODEKSTRİNAZLAR (CDaz)				
***A. flavithermus* (cda13)**	WK1	AY937388.1	AAX29991.1	586
EC 3.2.1.93: TREHALOZ-6-FOSFAT HİDROLAZ (Tre)				
A. gonensis	NCIMB 13933^T/ G2	CP012152.1:1367136-1368800	AKS38351.1	554
EC 3.2.1.41: PULLULANAZLAR (Pul)				
A. eryuanensis	73	KF151223.1	AGQ21978.1	706

Çizelge 5.20. α-Amilaz (amy) ve siklodekstrin glukanotransferaz (cgt) amino asit dizileri ile GenBank veri tabanında en çok benzerlik gösterdikleri referans türlerin (*) Neighbour-joining metodu kullanılarak oluşturulan dizi benzerlik matriksi

Kültür koleksiyon no/İzolat adı-Enzim	DSM 15730-cgt	cgt232-cgt*	DSM 17127-cgt	B2M1-cgt*	ET1 bscgt-cgt*	MB4-amy*	BCO1-amy*	NCIMB 13972-amy	DSM 14988-amy	DSM 17141-amy	DSM 15939-amy	DT3-1-amy*	A321-amy	DSM 22626-amy	A3210-amy	DSM 18475-amy	D222b-amy	E184ab-amy	E208a-amy	E184aa-amy	NCIMB 13933-amy	GXS-BL-amy*	DSM 2641-amy	NCIMB 13971-amy	SK3-4-amy*	KU2-6(11)-amy*	KCTC 13759-amy*	DSM 27374-amy*	DSM 12423-amy*	PS2-amy*	P3H1B-amy*	BAA-2555-amy*	WK1 cda13-cmd*	G2-tre*	73-pul*
***A. caldiproteolyticus* DSM 15730-cgt**	100																																			
B. stearothermophilus* cgt232-cgt	99,3	100																																		
***A. rupiensis* DSM 17127-cgt**	85,5	84,1	100																																	
Anoxybacillus* sp. B2M1-cgt	85,6	84,2	99,8	100																																
B. stearothermophilus* ET1 bscgt-cgt	85,6	84,2	99,8	99,9	100																															
A. mongoliensis* MB4-amy	46,3	44,5	44,2	44,4	44,2	100																														
Anoxybacillus* sp. BCO1-amy	46,3	45,9	45,7	45,9	45,7	99,9	100																													
***A. ayderensis* NCIMB 13972-amy**	46,2	44,3	44,0	44,2	44,1	99,5	99,6	100																												
***A. kamchatkensis* DSM 14988-amy**	46,4	44,5	44,1	44,2	44,1	99,3	99,2	99,3	100																											
***A. thermarum* DSM 17141-amy**	46,4	44,7	43,5	43,7	43,6	96,8	96,2	96,3	96,3	100																										
***A. amylolyticus* DSM 15939-amy**	45,8	43,7	43,4	43,6	43,5	95,4	94,8	95,6	95,6	94,7	100																									
Anoxybacillus* sp. DT3-1-amy	45,8	43,8	43,6	43,7	43,6	95,6	95,0	95,8	95,8	94,9	99,7	100																								
***Anoxybacillus* sp. A321-amy**	45,8	43,9	43,7	43,9	43,8	95,6	94,9	95,8	95,8	94,9	99,6	99,7	100																							
***A. salavatliensis* DSM 22626-amy**	45,8	43,8	43,6	43,8	43,7	95,5	94,9	95,7	95,7	94,9	99,5	99,7	99,7	100																						
***Anoxybacillus* sp. A3210-amy**	45,8	43,9	43,6	43,8	43,7	95,8	95,1	96,0	96,0	95,0	99,7	99,8	99,8	99,7	100																					
***A.* subsp. *asaccharedens* DSM 18475-amy**	45,8	43,9	43,6	43,8	43,6	95,4	94,6	95,5	95,6	94,9	99,2	99,2	99,2	99,3	99,3	100																				
***Anoxybacillus* sp. D222b-amy**	45,8	43,9	43,6	43,8	43,6	95,4	94,7	95,4	95,6	94,8	99,0	99,1	99,1	99,2	99,2	99,8	100																			
***Anoxybacillus* sp. E184ab-amy**	45,8	44,0	43,8	43,9	43,8	95,5	94,8	95,6	95,7	95,0	99,1	99,3	99,3	99,3	99,5	99,1	99,1	100																		
***Anoxybacillus* sp. E208a-amy**	45,8	43,9	43,7	43,9	43,8	95,4	94,8	95,5	95,6	95,0	99,1	99,2	99,2	99,3	99,4	99,1	99,0	99,9	100																	
***Anoxybacillus* sp. E184aa-amy**	45,8	44,0	43,8	43,9	43,8	95,4	94,8	95,6	95,6	95,0	99,2	99,3	99,3	99,4	99,5	99,1	99,0	99,9	99,9	100																
***A. gonensis* NCIMB 13933-amy**	45,4	43,8	43,6	43,8	43,7	95,7	95,0	95,8	95,9	95,0	99,2	99,3	99,3	99,3	99,5	98,9	98,9	99,3	99,2	99,2	100															
Anoxybacillus* sp. GXS-BL-amy	45,7	43,7	43,5	43,7	43,6	95,4	94,9	95,6	95,6	95,0	98,9	99,1	98,9	98,9	99,0	98,6	98,5	98,6	98,5	98,7	98,8	100														
***A. flavithermus* DSM 2641-amy**	46,4	44,3	44,3	44,5	44,3	90,9	90,7	90,9	91,1	90,7	91,0	91,2	91,0	91,0	91,1	90,6	90,6	91,0	90,9	91,0	91,0	91,4	100													
***A. kestanbolensis* NCIMB 13971-amy**	45,7	43,9	44,8	45,0	44,9	91,5	90,7	91,4	91,7	91,5	91,7	91,9	91,9	91,9	91,9	91,6	91,6	91,9	91,9	91,9	91,9	92,1	95,7	100												
Anoxybacillus* sp. SK3-4-amy	45,9	43,9	44,7	44,9	44,8	90,9	90,7	91,0	91,2	90,6	91,6	91,8	91,6	91,6	91,7	91,4	91,4	91,5	91,4	91,6	91,4	91,8	93,1	94,1	100											
Anoxybacillus* sp. KU2-6(11)-amy	46,7	43,9	43,9	44,1	43,9	93,3	93,6	93,0	93,3	92,7	91,5	91,6	91,6	91,6	91,8	91,4	91,4	91,6	91,6	91,6	91,8	91,7	92,7	93,4	92,2	100										
A.* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759-amy	46,1	44,2	43,9	44,1	44,0	90,0	90,2	90,0	90,2	89,8	89,6	89,7	89,6	89,6	89,8	89,4	89,4	89,6	89,6	89,6	89,6	89,5	90,6	90,9	91,0	91,9	100									
A. suryakundensis* DSM 27374-amy	46,3	44,5	44,2	44,4	44,2	90,2	90,3	90,2	90,4	90,1	89,6	89,8	89,7	89,7	89,8	89,4	89,3	89,6	89,5	89,6	89,6	89,7	91,0	91,0	90,8	91,9	98,4	100								
A. pushchinoensis* DSM 12423-amy	46,0	43,5	44,1	44,3	44,2	85,4	85,5	85,0	85,2	86,0	84,7	84,7	84,8	84,7	84,8	84,6	84,4	84,8	84,7	84,8	85,1	84,8	85,0	84,0	84,2	84,9	84,5	84,6	100							
A. tepidamans* PS2-amy	48,2	45,1	45,2	45,1	45,3	71,4	72,0	71,5	71,5	71,3	71,7	71,7	72,0	72,0	72,0	72,0	72,0	72,0	72,0	72,0	71,9	71,8	71,4	71,7	71,6	71,2	71,9	72,0	71,1	100						
Anoxybacillus* sp. P3H1B-amy	43,4	41,6	41,6	41,7	41,7	67,1	67,2	67,1	67,0	66,7	66,8	66,8	66,7	66,9	66,9	67,0	66,9	67,2	67,3	67,2	67,0	67,0	66,6	66,9	66,4	66,9	66,7	66,4	67,0	72,5	100					
A. geothermalis* ATCC BAA-2555-amy	43,1	42,4	41,6	41,7	41,7	68,9	71,1	69,0	69,1	69,1	68,9	69,0	69,1	69,0	69,1	68,9	68,8	69,2	69,3	69,2	69,2	69,2	68,3	68,5	68,6	68,9	68,9	68,9	69,2	72,0	65,7	100				
A. flavithermus* WK1 cda13-cmd	36,8	37,8	38,7	38,7	38,7	45,9	45,8	45,8	45,9	46,0	46,1	46,0	46,0	45,8	45,9	45,9	45,9	45,9	45,9	45,9	45,9	45,9	46,4	46,5	46,5	46,3	45,8	45,9	45,2	43,4	43,6	42,9	100			
A. gonensis* G2-tre	33,1	30,9	31,8	31,8	31,8	38,5	38,0	38,5	38,5	38,2	38,9	39,0	39,0	39,0	39,0	39,2	39,1	38,9	39,0	38,9	39,0	38,9	37,1	37,6	38,0	38,4	37,9	38,3	37,4	35,7	35,8	35,6	33,4	100		
A. eryuanensis* 73-pul	32,2	28,3	28,3	28,3	28,4	35,2	34,9	35,3	35,1	34,8	34,8	34,9	35,0	35,0	34,9	34,8	34,9	34,9	34,9	34,9	34,9	34,9	35,2	35,1	35,0	35,2	34,5	34,4	33,7	32,6	33,1	30,5	28,5	36,2	100	

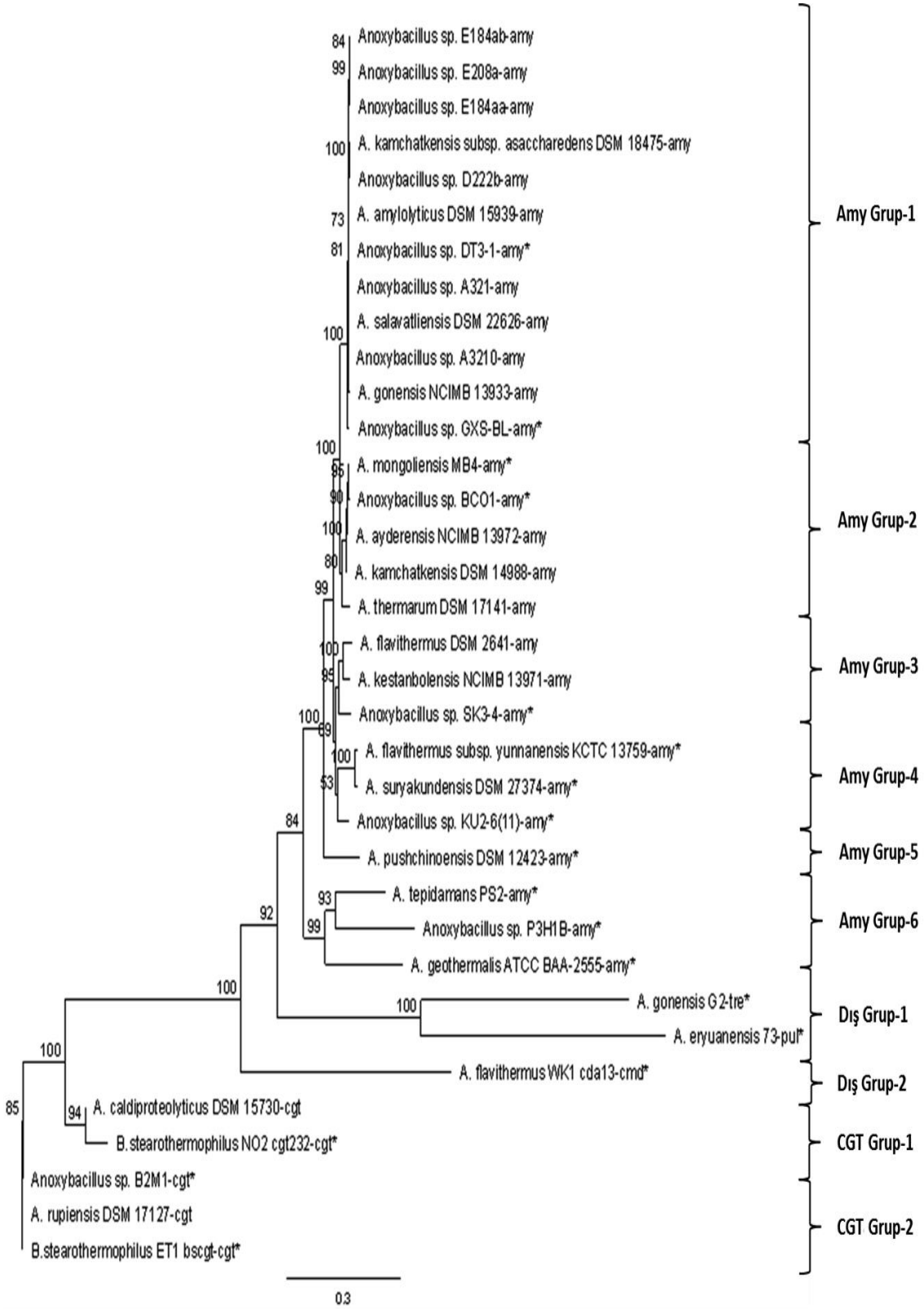
Amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz enzimlerinin amino asit dizileri ile gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda; tez çalışması kapsamında elde edilen tüm α-amilaz amino asit dizilerinin % 91.2-99.8 arasında değişen oranlarda en fazla referans *Anoxybacillus* sp. DT3-1 α-amilazına benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. *Anoxybacillus* sp. DT3-1 α-amilazına, A3210 izolatının α-amilaz dizisinin % 99.8; A321, *A. amylolyticus* DSM 15939^T ve *A. salavatliensis* DSM 22626^T referanslarına ait dizilerin % 99.7 oranında yüksek benzerlik gösterdiği, en düşük benzerliği ise % 43.6 oranı ile *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T ve *A. rupiensis* DSM 17127^T CGTaz dizilerinin gösterdiği bulunmuştur. *Anoxybacillus* sp. BCO1 α-amilazına, *A. ayderensis* NCIMB 13972^T (% 99.6), *A. kamchatkensis* DSM 14988^T (% 99.2) ve *A. thermarum* DSM 17141^T (% 96.2) dizileri % 96'nın üzerinde, *A. rupiensis* DSM 17127^T CGTazı ise % 45.7 oranı ile en düşük dizi benzerliği göstermiştir. *A. mongoliensis* MB4 α-amilazına, yine *A. ayderensis* NCIMB 13972^T (% 99.5), *A. kamchatkensis* DSM 14988^T (% 99.3) ve *A. thermarum* DSM 17141^T (% 96.8) dizileri % 96'nın üzerinde, *A. rupiensis* DSM 17127^T referansı ise % 44.2 oranında en düşük benzerlik göstermiştir. *Anoxybacillus* sp. SK3-4 α-amilazına ise en çok dizi benzerliği gösterenler, *A. kestanbolensis* NCIMB 13971^T (% 94.1) ve *A. flavithermus* DSM 2641^T (% 93.1) referans dizileridir. En düşük benzerliği ise % 44.7 oranı ile *A. rupiensis* DSM 17127^T referans dizisi göstermiştir. *Anoxybacillus* sp. GXS-BL α-amilazına A3210 ile *A. amylolyticus* DSM 15939^T, A321 ve *A. salavatliensis* DSM 22626^T bakterilerin α-amilaz dizileri sırasıyla % 99.0 ve % 98.9 oranında, *A. rupiensis* DSM 17127^T referansı ise % 43.5 oranında benzerlik göstermiştir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen CGTaz amino asit dizilerinden; *A. rupiensis* DSM 17127^T dizisi % 99.8 oranında en fazla *Anoxybacillus* sp. B2M1 ve *B. stearothermophilus* ET1 CGTaz'larına, *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T dizisi ise % 99.3 oranında en fazla *B. stearothermophilus* cgt232 CGTaz'ına benzerlik göstermiştir. Tüm α-amilaz dizilerinin *Anoxybacillus* sp. P3H1B α-amilazına, tüm CGTaz dizilerinin ise *Anoxybacillus* sp. P3H1B ve *A. geothermalis* ATCC BAA-2555 α-amilazlarına oldukça düşük oranlarda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında ortaya çıkarılan olası α-amilazların amino asit dizileri kendi içlerinde değerlendirildiklerinde; E184aa, E184ab ve E208a izolatlarına ait amilaz amino asit dizileri birbirlerine % 99.9 oranında benzerlik göstermiştir. D222b izolatı ile *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T referans dizilerinin birbirlerine % 99.8

oranında, A321 ve A3210 kodlu izolatların amilaz dizilerinin de birbirlerine % 99.8 oranında benzedikleri belirlenmiştir. A321 izolatının amilaz dizisi, *A. salavatliensis* DSM 22626^T ve *A. amylolyticus* DSM 15939^T amilaz dizilerine sırasıyla % 99.7 ve % 99.6 oranında; A3210 izolatının dizisi ise *A. gonensis* NCIMB 13933^T dizisine % 99.5 oranında benzerlik göstermiştir. *A. kamchatkensis* DSM 14988^T dizisi ise % 99.3 oranı ile en fazla *A. ayderensis* NCIMB 13972^T dizisine benzerlik göstermiştir. Ayrıca, diğer amilaz gen dizilerimizle kıyaslandığında, *A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. thermarum* DSM 17141^T ve *A. kestanbolensis* NCIMB 13971^T dizilerinin benzerlik oranlarının nispeten daha düşük olduğu belirlenmiştir. İki CGTaz dizisi kendi içlerinde değerlendirildiklerinde; *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T ve *A. rupiensis* DSM 17127^T amino asit dizilerinin birbirlerine % 85.5 oranında benzerlik gösterdiği ve diğer tüm amilaz dizilerine ise benzerlik oranlarının oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir.

Anoxybacillus izolatlarının ve referans türlerinin α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz amino asit dizilerinin en çok benzerlik gösterdikleri referans diziler temel alınarak oluşturulmuş filogenetik ağaç (Şekil 5.19) incelendiğinde; 27 α-amilaz, 5 siklodekstrin glukanotransferaz ve *Anoxybacillus* türlerine ait 3 dış grubun protein dizisi olmak üzere toplam 35 amino asit dizisinin toplam 10 filogenetik gruba (klad) ayrıldıkları görülmektedir. Bu kladlara dahil olan bakteriler, gerçekleştirilen amilolitik enzim aktivite koşulları ve sonuçları, α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz PCR reaksiyonlarında her bir bakteri için spesifik olan kullanılan T_m, $MgCl_2$ konsantrasyon değerleri ve primer çiftleri ile kladlarda yer alan dizilerin klad içi benzerlik oranları Çizelge 5.21'de sunulmuştur. Buna göre, GH13 familyasına dahil α-amilazlar Amy-1 ile Amy-6 arasında gruplandırılan 6, siklodekstrin glukanotransferazlar 2 (CGT-1 ve CGT-2) ve dış grup olarak ele alınan enzimler ise 2 (dış grup-1 ve 2) klad altında kümelenmiştir.



Şekil 5.19. *Anoxybacillus* α-amilaz (amy) ve siklodekstrin glukanotransferaz (cgt) amino asit dizilerinin en çok benzerlik gösterdikleri referans amino asit dizileri (*) temel alınarak, Neighbour-joining metoduna göre oluşturulmuş ve evrimsel uzaklığı gösteren filogenetik ağaç. Bar her 100 nükleotid pozisyonundaki 0.3'lük bir yer değişikliğini işaret etmektedir.

İlk enzim grubu olan *α-amilaz* protein dizilerinin ***Amy-1*** kladı, 12 dizi ile en kalabalık, nişastaya karşı genel olarak 65°C'de, pH 7.0'de en yüksek amilolitik aktivite sergileyen ve birbirlerine oldukça yüksek dizi benzerliği gösteren (% 98.5-99.9) ilk filogenetik grubu oluşturmuştur. Ayrıca, 6 izolatımızın tamamının (A321, A3120, D222b, E184aa, E184ab ve E208a) bu klad içerisine dahil olduğu görülmektedir. İkinci grup olan ***Amy-2*** kladı, pH 8.0'de oldukça düşük amilolitik aktivite gösteren ve *A. thermarum* (en çok *A. mongoliensis'*e % 96.8) hariç, diğer üyelerin birbirine yüksek dizi benzerliği gösterdiği (% 99.2-99.9) 5 α-amilaz dizisi içermektedir. ***Amy-3 kladı***, birbirlerine düşük dizi homolojisi gösteren (% 93.1-95.7) ve referans *Anoxybacillus* sp. SK3-4 α-amilazı dışında yüksek amilolitik aktiviteye sahip *A. flavithermus* ile *A. kestanbolensis* α-amilaz dizilerinden oluşmaktadır. Dördüncü grup olan ***Amy-4 kladı***, % 91.9-98.4 gibi oldukça heterojen bir dizi homolojisi sergileyen, referans *Anoxybacillus* sp. KU2-6(11) α-amilazı ile düşük amilolitik aktivite gösteren *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* ve *A. suryakundensis* α-amilaz dizilerini içermektedir. Sadece tek türle temsil edilen ***Amy-5*** kladında, *A. pushchinoensis* α-amilazı en çok % 86.0 oranında *A. thermarum*'un α-amilazına benzerlik göstermiştir. Son α-amilaz kladı olan ***Amy-6*** üyeleri birbirlerine % 65.7-72.5 oranında, diğer kladlardaki protein dizilerine ise çok düşük dizi benzerliği göstererek açıkça farklı oldukları görülen 3 α-amilaz dizisinden oluşmaktadır.

Siklodekstrin glukanotransferaz grubuna dahil olan ve düşük amilolitik aktivite gösteren *A. caldiproteolyticus* ve *A. rupiensis* dizileri iki farklı klad içerisinde kümelenmiştir. İlk ***CGT-1 kladı***, dizilerimizden *A. caldiproteolyticus* ile *B. stearothermophilus* cgt232 protein dizilerini (% 99.3 benzerlik), ikinci ***CGT-2 kladı*** ise dizilerimizden *A. rupiensis* ile birlikte *Anoxybacillus* sp. B2M1 ve *B. stearothermophilus* bscgt protein dizilerini (% 99.8-99.9 benzerlik) kapsamaktadır.

Çizelge 5.21. *Anoxybacillus* izolatlarının ve referans türlerin α-amilaz ve CGTaz amino asit dizilerinin en çok benzerlik gösterdikleri referans amino asit dizileri (*) temel alınarak Neighbour-joining metoduna göre oluşturulmuş filogenetik kladlar ve özellikleri (* Tez kapsamında çalışılmayan, ancak NCBI-BLASTP taramasında dizilerimize yüksek benzerlik gösteren α-amilaz ve CGTaz amino asit dizileri GenBank veri tabanından alınarak filogenetik analizlere dahil edilmiştir. TE: test edilmedi)

Amilazların amino asit dizilerine göre oluşturulan						
Filogenetik kladlar	**Bakteriler**	**Amilaz aktivitesi**		**Enzim aktivitesi (pH/sıcaklık)**	**PCR reaksiyonu (T_m/$MgCl_2$/primer) /GenBank Aksesyon Numarası**	**Klad üyelerinin benzerlik oranları**
		Kalitatif	**Kantitatif (U/mL)**			
Amy-1	E184ab	+++	5.94	7.0/65°C	55°C/2.5 mM/amy	% 98.5 -99.9
	E208a	++	0.37	7.0/65°C	55°C/2.5 mM/amy	
	E184aa	+++	5.74	7.0/65°C	58°C/2.0 mM/amy	
	A. kamchatkensis subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T	++	0.66	7.5/55°C	55°C/2.5 mM/amy	
	D222b	+++	4.81	7.0/65°C	58°C/2.0 mM/amy	
	A. amylolyticus DSM 15939^T	+++	3.22	7.0/65°C	58°C/2.0 mM/amy	
	Anoxybacillus sp. DT3-1	TE	TE	TE	(JF932308.1)*	
	A321	+	0.20	7.0/65°C	58°C/2.0 mM/amy	
	A. salavatliensis DSM 22626^T	+++	3.28	7.0/65°C	58°C/2.0 mM/amy	
	A3210	+	0.18	7.0/65°C	55°C/2.5 mM/amy	
	A. gonensis NCIMB 13933^T	++	0.27	7.5/55°C	58°C/2.0 mM/amy	
	Anoxybacillus sp. GXS-BL	TE	TE	TE	(JF946749.1)*	
Amy-2	*A. mongoliensis* MB4	+	0.24	8.0/60°C	(NZ_MRZM01000007.1:20882-22396)*	% 99.2-99.9
	Anoxybacillus sp. BCO1	TE	TE	TE	(JRLC01000004.1:24870-26120)*	
	A. ayderensis NCIMB 13972^T	++	0.67	8.0/55°C	55°C/2.5 mM/amy	
	A. kamchatkensis DSM 14988^T	⊥	0.07	8.0/60°C	58°C/2.0 mM/amy	
	A. thermarum DSM 17141^T	⊥	0.05	7.0/60°C	58°C/2.0 mM/amy	% 96.8 (*A. mongoliensis*)
Amy-3	*A. flavithermus* DSM 2641^T	+++	4.93	7.0/65°C	55°C/2.5 mM/amy	% 93.1-95.7
	A. kestanbolensis NCIMB 13971^T	++	1.17	8.0/55°C	55°C/2.5 mM/amy	
	Anoxybacillus sp. SK3-4	TE	TE	TE	(JF932307.1)*	
Amy-4	*A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T	⊥	0.14	7.0/60°C	(NZ_KN127221.1:c47860-49374)*	% 91.9-98.4
	A. suryakundensis DSM 27374^T	+	0.28	7.5/55°C	(NZ_CYGZ01000003.1:131735-133249)*	
	Anoxybacillus sp. KU2-6(11)	TE	TE	TE	(NZ_JPZN01000005.1:26075-27589)*	
Amy-5	*A. pushchinoensis* DSM 12423^T	+	-	-	(FOJQ01000016.1:15625-17142)*	% 86.0 (*A. thermarum*'a)
Amy-6	*A. tepidamans* PS2	+	0.51	7.5/55°C	(NZ_JHVN01000005.1:c124684-126216)*	% 65.7-72.5
	Anoxybacillus sp. P3H1B	TE	TE	TE	(NZ_LPUG01000012.1:203512-205044)*	
	A. geothermalis ATCC BAA-2555^T	TE	TE	TE	(NZ_JYCG01000312.1:c4837-6372)*	
Siklodekstrin glukanotransferazların amino asit dizilerine göre oluşturulan						
Filogenetik kladlar	**Bakteriler**	**Amilaz aktivitesi**		**Enzim aktivitesi (pH/sıcaklık)**	**PCR reaksiyonu (T_m/$MgCl_2$/primer) /GenBank Aksesyon Numarası**	**Klad üyelerinin benzerlik oranları**
		Kalitatif	**Kantitatif (U/mL)**			
CGT-1	*A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T	⊥	0.10	7.0/60°C	55°C/2.5 mM 52°C/2.0 mM (d-amy/cgt)	% 99.3
	B. stearothermophilus NO2 cgt232	TE	TE	TE	(X59044.1)*	
CGT-2	*Anoxybacillus sp.* B2M1	TE	TE	TE	(CP015435.1:784808-786943)*	% 99.8-99.9
	A. rupiensis DSM 17127^T	+	0.22	6.5/55°C	55°C/2.5 mM 52°C/2.0 mM (d-amy/cgt)	
	B. stearothermophilus ET1 bscgt	TE	TE	TE	(U83799.1)*	

5.6.5. α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ AMİNO ASİT DİZİLERİNİN *IN SİLİKO* ANALİZLERİ

Çalışma kapsamında, izolatlardan ve referans türlerden elde edilen amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz gen dizileri Mega6 programı kullanılarak olası doğru çerçevedeki amino asit dizilerine dönüştürülmüştür. Tez kapsamında elde edilen olası 15 amilaz ve 2 siklodekstrin glukanotransferaz amino asit dizileri ile BLASTP sonuçlarına göre, kendi dizilerimize en çok benzerlik gösteren ve karşılaştırma amacıyla kullanılan GenBank'taki referans 12 amilaz ve 3 CGTaz protein dizileri (Çizelge 5.21) Clustal OMEGA programı kullanılarak hizalanmıştır. Böylece, NCBI-korunmuş domain arama programı kullanılarak olası amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz protein dizilerinde belirlenen korunmuş domainler ve katalitik bölgeler alt alta eşleştirilmiştir.

Tez kapsamında elde edilen 15 α-amilaz protein dizisi ve bu dizilere en çok benzerlik gösteren 12 referans dizi olmak üzere toplam 27 α-amilaz protein dizisi, 504 amino asitlik E184aa izolatının amilaz dizisine göre hizalanmış ve elde edilen korunmuş dizi bölgeleri (CSR), aktif/katalitik bölgeler, substrat ve kalsiyum bağlanma bölgeleri gibi enzim aktivitesi ve substrat bağlanması için önemli amino asitler işaretlenerek Şekil 5.20'de sunulmuştur. Protein dizileri, B domainini içeren katalitik $(\beta/\alpha)_8$-fiçı domain yapısının önemli bir kısmı olan, CSR-VI bölgesinin (Gly80 ile başlayan β_2 iplikçiği) başlangıcından CSR-VII bölgesinin (Thr349 ile biten β_8 iplikçiği) sonuna kadar uzanan dizileri kapsayacak şekilde hizalanmıştır. Hizalama sonucunda, dizilerde α-amilaz ailesi GH13 üyelerinde karakteristik olarak bulunan 7 korunmuş dizi bölgesinin (CSR I-VII) varlığı (242) tespit edilmiştir. Korunmuş dizi bölgelerinin sınırları, Janecek (1997 ve 2002), Janecek ve ark. (2014 ve 2015) tarafından gerçekleştirilen biyoinformatik çalışmalara dayanılarak belirlenmiştir (240, 242, 246, 257).

```
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                                  ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                              ----------------------------------------------------MKNVWRI   7
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                              ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy*            ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                                ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. amylolyticus DSM15939-Amy                                 ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                                 ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy           ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. salavatliensis DSM22626-Amy                               ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
Anoxybacillus sp. A321-Amy                                   ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                                 ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                                  ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                                 ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                                  ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. gonensis NCIMB13933-Amy                                   ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                                  ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. thermarum DSM17141-Amy                                    ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                                 ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                                ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. mongoliensis MB4-Amy*                                     ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                                 ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*                             ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy                             ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. flavithermus DSM2641-Amy                                  ----------------------------------------------------MKRVFRA   7
A. tepidamans PS2-Amy*                                       ----------------------------------------------------MKRILAS   7
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*                           ----------------------------------------------------MGNRLFM   7
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                                 ----------------------------------------------------MKRAFVS   7
```

Şekil 5.20. Tez kapsamında elde edilen olası α-amilaz amino asit dizileri (Amy) ile karşılaştırma amacıyla kullanılan referans α-amilaz enzimlerinin (Amy*) amino asit dizi hizalaması ve korunmuş dizi bölgeleri (CSR: conserved sequence region). Renk kodlaması: katalitik aspartatlar ve glutamat (katalitik üçlü)- kırmızı (*); fonksiyonel histidinler- açık mavi; değişmeyen arjinin- pembe (#); çok iyi korunmuş aspartat- yeşil; iki ardışık triptofan- turkuaz; Ca^{+2}-bağlanma bölgeleri (Ca1-*; Ca2-*; Ca3-*; Ca4-*)- turuncu; maltoz bağlanma bölgeleri- lacivert; yapısal olarak önemli amino asit kökleri, glisin- mor ve prolin- koyu sarı; korunmuş amino asit kökleri- sarı; C-terminal uçtaki korunmuş aromatik amino asit kökleri (▲), tirozin- açık yeşil ve fenilalanin- gri. Korunmuş olmayan amino asit kökleri renklendirilmemiştir.

```
                                                                                                  * *  *
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                      LL-VFILLLS---VTTPA-----------SAKTERTW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                  CL-AIILLFS---FALPA-----------SAKTERTW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                  LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERTW--QDERV-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy* LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERTW--QDERV-YFIMVDRFNNGNPKN   49
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                    LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERAW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. amylolyticus DSM15939-Amy                     LL-IFVLLLS---LTTRA-----------SAKTERAW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                     LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERAW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy LL-IFVLLLS---LTTPA-----------SAKTERAW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. salavatliensis DSM22626-Amy                   LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERAW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
Anoxybacillus sp. A321-Amy                       LL-IFVLMLS---VTTPA-----------SAKTERAW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                     LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERAW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                      LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERAW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                     LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERAW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                      LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERAW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. gonensis NCIMB13933-Amy                       LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERAW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                      LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERAW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. thermarum DSM17141-Amy                        LL-AFILLLS---VTTPA-----------SAKTERTW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                     LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERTW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                    LL-IFVLLLS---VTTPA-----------SAKTERTW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. mongoliensis MB4-Amy*                         LL-VFILLLS---VTTPA-----------SAKTERTW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                     LL-IFALLLS---VTTPV-----------SAKTERTW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*                 LL-VFILLLS---VTTPA-----------SAKTERTW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy                 LL-IFVLLLS---VTAPV-----------SAKTERTW--QDERI-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. flavithermus DSM2641-Amy                      LL-IFVLLLS---VTAPV-----------SAKTERTW--QDERV-YFIMVDRFNNGNPKN   49
A. tepidamans PS2-Amy*                           FL-AVFFLLA---AAVPA--------R-AESGGKRTW--QDESI-YFIMVDRFNNMDPTN   51
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*               LL-VLPFLLF---YAWPV--------Q-AAEKEERTW--QDEAI-YFIMVDRFNNMDPTN   51
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                     SL-ALLFLLS---FAIPA--------Q-ADTNEKRTW--QDETV-YFMTVDRFNNLDSTS   51
```

Şekil 5.20. (devam)

```
                                                                                  β2
                                                                                CSR-VI
                                                *                 * *                                  *
Anoxybacillus sp.BCO1-Amy*                      DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKGMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                 DY------DVDVHDPKAYHGGDLQGVID----KL--DYIKDMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                 DY------EVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy* DY------EVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                   DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. amylolyticus DSM15939-Amy                    DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                    DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. kamchatkensis subsp.asaccharedens DSM18475-Amy DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. salavatliensis DSM22626-Amy                  DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
Anoxybacillus sp. A321-Amy                      DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                    DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                     DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                    DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                     DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. gonensis NCIMB13933-Amy                      DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                     DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. thermarum DSM17141-Amy                       DY------DVDVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKGMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                    DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKGMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                   DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKGMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. mongoliensis MB4-Amy*                        DY------DVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKGMGFTAIWLTPIFAN-----   92
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                    DY------EVDVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFAN-----   92
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*                DY------EVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKGMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy                DY------EVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKGMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. flavithermus DSM2641-Amy                     DY------EVNVHDPKAYHGGDLQGIID----KL--DYIKGMGFTAIWLTPIFAN-----   92
A. tepidamans PS2-Amy*                          DQ------DVNINNPRGYFGGDLKGVTA----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFKN-----   94
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*              DK------GVNVNDPKGYFGGDLKGVTA----KL--DYIKEMGFTAIWLTPIFEN-----   94
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                    DQ------GVNVKDPRAYFGGDLKGITA----KL--DYIQSMGFTAIRLTPIFQT-----   94
```

Şekil 5.20. (devam)

```
                                                                                                β3
                                                                                              CSR-I
                                                                   *         *                      *
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                      ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                  ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                  ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy* ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                    ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. amylolyticus DSM15939-Amy                     ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                     ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. salavatliensis DSM22626-Amy                   ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTVDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
Anoxybacillus sp. A321-Amy                       ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                     ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                      ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                     ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                      ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. gonensis NCIMB13933-Amy                       ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                      ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. thermarum DSM17141-Amy                        ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                     ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                    ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. mongoliensis MB4-Amy*                         ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                     ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*                 ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy                 ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. flavithermus DSM2641-Amy                      ----EKGGYHGYWIEDFYKVE--------EHFGTLDDFKRLVKEAHKRDMKVILDFVVNH   140
A. tepidamans PS2-Amy*                           ----EPGGYHGYWVSDFYQVD--------PHFGTLADLKTLVKEAHKRGMKVILDFVANH   142
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*               ----MPGGYHGYWIKDFYRVD--------PHFGTLDDLKTLVKEAHQRDMKVILDFVANH   142
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                     ----EPGDYQGKKVTDFYKVD--------PHFGTLSDLKTLVKEAHKRQLKVILDFVTNH   142
```

Şekil 5.20. (devam)

```
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                          TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                      TGYNHPWLNDP------------------SKKDWFHEKKDIFNW---------A-DQQEV   172
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                      TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy*    TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                        TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. amylolyticus DSM15939-Amy                         TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                         TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy   TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. salavatliensis DSM22626-Amy                       TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
Anoxybacillus sp. A321-Amy                           TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                         TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                          TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                         TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                          TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. gonensis NCIMB13933-Amy                           TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                          TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. thermarum DSM17141-Amy                            TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                         TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                        TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. mongoliensis MB4-Amy*                             TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                         TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*                     TGYNHPWLNDP------------------AKKDWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy                     TGYNHPWLNDP------------------AKKEWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. flavithermus DSM2641-Amy                          TGYNHPWLNDP------------------AKKEWFHEKKDIFNW---------A-NQQEV   172
A. tepidamans PS2-Amy*                               VGPHHPWVNDP------------------TKKGWFHEKKDIVNW---------A-DPKEV   174
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*                   VGYDHPWLRDP------------------AKKDWFHPKKEIFDW---------N-DQTQL   174
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                         TSSRHPWINDP------------------AKKDWYHEKREISDW---------N-NPQQI   174
```

Şekil 5.20. (devam)

```
                                                   loop3                WW          β4
                                                   CSR-V                            CSR-II
                                                *   *                              # *   *
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                     E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIQETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                 E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIQETDIDGYRLDTVKHVPKWF-------   222
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                 E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLLDVAKWWIQETDIDGYRLDTVKHVPKWF-------   222
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy* E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLLDVAKWRIQETDIDGYRLDTVKHVPKWF-------   222
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                   E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
A. amylolyticus DSM15939-Amy                    E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                    E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFAVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
A. salavatliensis DSM22626-Amy                  E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
Anoxybacillus sp. A321-Amy                      E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                    E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                     E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                    E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                     E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
A. gonensis NCIMB13933-Amy                      E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                     E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFAVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
A. thermarum DSM17141-Amy                       E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIQETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                    E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIKETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                   E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIQETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
A. mongoliensis MB4-Amy*                        E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIQETDVDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                    E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKTYLFDVAKWWIQETDIDGYRLDTVKHVPKWF-------   222
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*                E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIQETDIDGYRLDTVKHVPKWF-------   222
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy                E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIQQTDIDGYRLDTVKHVPKSF-------   222
A. flavithermus DSM2641-Amy                     E-N--GWLFGLPDLAQENPEVKAYLFDVAKWWIQQTDIDGYRLDTVKHVPKWF-------   222
A. tepidamans PS2-Amy*                          E-N--GWLYGLPDLAQENPEVKRYLIDAAKWWIKETDIDGYRLDAMKHVPKSF-------   224
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*              E-N--GWVYGLPDLAQENPEVKKYLIDAAKWWIKETDIDGYRLDTVRHVPKSF-------   224
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                    E-T--GWLNGLPDLAQENPEVKRYLIDAAKWWIKETNIDGYYLDDAGHVPKSF-------   224
```

Şekil 5.20. (devam)

```
                                                                                  β5
                                                                              CSR-III
                                                                                    *
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                   --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*               --------------------WEEFAKEVKSVKEDFFLLGEVWHDD------PRYVAQYGK   256
A. suryakundensis DSM27374-Amy*               --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy*  --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                 --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. amylolyticus DSM15939-Amy                  --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                  --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy  --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. salavatliensis DSM22626-Amy                --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
Anoxybacillus sp. A321-Amy                    --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                  --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                   --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                  --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                   --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. gonensis NCIMB13933-Amy                    --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                   --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. thermarum DSM17141-Amy                     --------------------WDEFSKEVRSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                  --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                 --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. mongoliensis MB4-Amy*                      --------------------WDEFSKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                  --------------------WDEFAKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*              --------------------WDEFAKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy              --------------------WDEFAKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. flavithermus DSM2641-Amy                   --------------------WDEFAKEVKSVKQDFFLLGEVWHDD------PRYVAEYGK   256
A. tepidamans PS2-Amy*                        --------------------WQEFSREVKSVKKDFFLLGEVWSDD------PRYIADYGK   258
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*            --------------------WQEFAKEVKSVKQDFFLLGEVWSDD------PRYIAEYGQ   258
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                  --------------------WQEFSNEVKAVKKDFYLLAGIDSND------PRYIADYEK   258
```

Şekil 5.20. (devam)

```
                                                                                *
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                    HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------IGPLYNVWKRNAAFYDRPYL   301
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                LGIDALIDFPFYKEASTIFSNIDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDDPYL   301
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                HGIDALIDFPFYKEASAIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNEAFYERPYL   301
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy*  HGIDALIDFPFYKEASAIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNEAFYERPYL   301
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                  HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
A. amylolyticus DSM15939-Amy                   HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                   HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVTFYDRPYL   301
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy  HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
A. salavatliensis DSM22626-Amy                 HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
Anoxybacillus sp. A321-Amy                     HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                   HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                    HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                   HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                    HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
A. gonensis NCIMB13933-Amy                     HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                    HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
A. thermarum DSM17141-Amy                      HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                   HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------IGPLYNVWKRNAAFYDRPYL   301
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                  HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------IGPLYNVWKRNAAFYDRPYL   301
A. mongoliensis MB4-Amy*                       HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------IGPLYNVWKRNAAFYDRPYL   301
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                   HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYERPYL   301
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*               HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNAAFYDRPYL   301
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy               HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   301
A. flavithermus DSM2641-Amy                    HGIDALIDFPFYKEASTIFSNVDQS---------------LGPLYNVWKRNEAFYDRPYL   301
A. tepidamans PS2-Amy*                         YGIDGFIDFPFYKEASATLSSADQS---------------LGPLYNVWKRNVAFYDRPYL   303
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*             YGIDGFVDYPLYGAVKQSLARRDAS---------------LRPLYDVWEYNKTFYDRPYL   303
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                   DGIDGFLDYPFYNEASKVLSNVNQS---------------LAPLYRVWKNNVSYYDHPYL   303
```

Şekil 5.20. (devam)

```
                                                   β7                                                  β8
                                                CSR-IV                                              CSR-VII
                                                    *
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                     LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGMPIMYYGTEIALDGG   356
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                 LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFSAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                 LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFSAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy* LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFSAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                   LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
A. amylolyticus DSM15939-Amy                    LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                    LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
A. salavatliensis DSM22626-Amy                  LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
Anoxybacillus sp. A321-Amy                      LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                    LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                     LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                    LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                     LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
A. gonensis NCIMB13933-Amy                      LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                     LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
A. thermarum DSM17141-Amy                       LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                    LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGMPIMYYGTEIALDGG   356
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                   LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
A. mongoliensis MB4-Amy*                        LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGMPIMYYGTEIALDGG   356
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                    LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFSAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*                LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFSAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy                LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFAAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
A. flavithermus DSM2641-Amy                     LGTFLDNHDTVRF-----TRLALQNRINPVTRLKLGLTYLFSAPGIPIMYYGTEIALDGG   356
A. tepidamans PS2-Amy*                          LGTFLDNHDTVRF-----TKLALDHKQNPITRIKLGLTYLFTAPGIPIMYYGTEIALNGG   358
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*              LGTFLDNHDNVRF-----TKLSIDNRNNPISRIKLAMTYLFTAPGIPIMYYGTEIAMNGG   358
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                    LGTFLDNDRTVRF-----TRLALENKQNPITRMKLGLAYLFSAPGVPIVYYGTEIVLDGG   358
```

Şekil 5.20. (devam)

```
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                                EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                            EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                            EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy*          EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                              EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. amylolyticus DSM15939-Amy                               EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                               EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy         EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. salavatliensis DSM22626-Amy                             EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
Anoxybacillus sp. A321-Amy                                 EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                               EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                                EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                               EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                                EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. gonensis NCIMB13933-Amy                                 EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                                EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. thermarum DSM17141-Amy                                  EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                               EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                              EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. mongoliensis MB4-Amy*                                   EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                               EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*                           EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy                           EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. flavithermus DSM2641-Amy                                EDPD------NRRLMNFRTDK----------------------------------------   371
A. tepidamans PS2-Amy*                                     NDPD------NRRLMDFRTDK----------------------------------------   373
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*                         EDPD------NRRLMDFRADP----------------------------------------   373
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                               KAPD------NHRLMNFRTDD----------------------------------------   373
```

Şekil 5.20. (devam)

```
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                          -------------------------------ELVDYVTKLGELRENFRRFVAVILN----   396
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                      -------------------------------ELIDYVTKLGELREKLPSLRRGDFE----   396
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                      -------------------------------ELIDYVTKLGELREKLPSLRRGDFE----   396
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy*    -------------------------------ELIDYVTKLGELREKLPSLRRGDFE----   396
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                        -------------------------------ELIDYVTKLGELREKLPSLRRGDFE----   396
A. amylolyticus DSM15939-Amy                         -------------------------------ELIDYVTKLGELRETLPSLRRGDFE----   396
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                         -------------------------------ELIDYVTKLGELRETLPSLRRGDFE----   396
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy   -------------------------------ELIDYVTKLGELRETLPSLRRGDFE----   396
A. salavatliensis DSM22626-Amy                       -------------------------------ELIDYVTKLGELRETLPSLRRGDFE----   396
Anoxybacillus sp. A321-Amy                           -------------------------------ELIDYVTKLGELRETLPSLRRGDFE----   396
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                         -------------------------------ELIDYVTKLGELRETLPSLRRGDFE----   396
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                          -------------------------------ELIDYVTKLGELRETLPSLRRGDFE----   396
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                         -------------------------------ELIDYVTKLGELRETLPSLRRGDFE----   396
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                          -------------------------------ELIDYVTKLGELRETLPSLRRGDFE----   396
A. gonensis NCIMB13933-Amy                           -------------------------------ELIDYVTKLGELRETLPSLRRGDFE----   396
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                          -------------------------------ELIDYVTKLGELRETLPSLRRGDFE----   396
A. thermarum DSM17141-Amy                            -------------------------------ELIDYVTKLGELREKLPALRRGDFE----   396
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                         -------------------------------ELVDYVTKLGELREKLPSLRRGDFE----   396
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                        -------------------------------ELVDYVTKLGELREKLPSLRRGDFE----   396
A. mongoliensis MB4-Amy*                             -------------------------------ELVDYVTKLGELREKLPSLRRGDFE----   396
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                         -------------------------------ELIDYVTKLGELRAKLPSLRRGDFE----   396
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*                     -------------------------------ELIDYVTKLGELREKLPSLRRGDFE----   396
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy                     -------------------------------ELIDYVTKLGELREKLPSLRRGDFE----   396
A. flavithermus DSM2641-Amy                          -------------------------------ELVDYVTKLGELREKLPSLRRGDFE----   396
A. tepidamans PS2-Amy*                               -------------------------------EIIDYITKIGELRQQLPSLRRGDFT----   398
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*                   -------------------------------EIIDYLKKIGPLRQQLPSLRRGDFT----   398
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                         -------------------------------EVVNYIKKLGELRGQLPSLRRGDFT----   398
```

Şekil 5.20. (devam)

```
                                                                  *
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                                --CFMK-------------------KTAWLCLNGRMKRKRR*-----------------   416
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                            --LLYEQG--GMAVFK----RTYEEETTLIAINNTSKTQKVTFT--DE---LEQGKE-LR   442
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                            --LLYEKD--GMALFK----RTYKNETAVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGRE-LR   442
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy*          --LLYEKD--GMALFK----RTYKNETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                              --LLYEKD--GMALFK----RTYEKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
A. amylolyticus DSM15939-Amy                               --LLYEKD--GMALFK----RTYGKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                               --LLYEKD--GMALFK----RTYGKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy         --LLYEKD--GMALFK----RTYGKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
A. salavatliensis DSM22626-Amy                             --LLYEKD--GMALFK----RTYGKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
Anoxybacillus sp. A321-Amy                                 --LLYEKD--GMALFK----RTYGKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                               --LLYEKD--GMALFK----RTYGKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                                --LLYEKD--GMALFK----RTYGKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                               --LLYEKD--GMALFK----RTYGKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                                --LLYEKD--GMALFK----RTYGKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
A. gonensis NCIMB13933-Amy                                 --LLYEKD--GMALFK----RTYGKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                                --LLYEKD--GMALFK----RTYGKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
A. thermarum DSM17141-Amy                                  --LLYEKD--GMALFK----RTYEKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                               --LLYEKD--GMALFK----RTYEKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                              --LLYEKD--GMALFK----RTYEKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
A. mongoliensis MB4-Amy*                                   --LLYEKD--GMALFK----RTYEKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                               --LLYEKD--GMALFK----RTYEKETTVIAINNTSKTQKVTLD--GE---LEQGKE-LR   442
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*                           --LLYEKD--GMALFK----RTYENETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy                           --LLYEKD--GMALFK----RTYENETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
A. flavithermus DSM2641-Amy                                --LLYEKD--GMALFK----RTYEKETTVIAINNTSKTQKVTLD--DE---LEQGKE-LR   442
A. tepidamans PS2-Amy*                                     --LLYEKN--GMAVFK----RTYKKETAVIAINNTTKTQKVHLT-NDQ---LAPGKE-LR   445
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*                         --LLYEKD--GMAVWK----RQYKDETTVIAINNTGKTQHVHLT-NDQ---LPKNKE-LR   445
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                               --LLYEKK--GMAVFK----RTYKGETAVIAINNTNKTQKVHLT-NAQ---LATGKE-LR   445
```

Şekil 5.20. (devam)

```
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                                  ------------------------------------------------------------   416
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                              GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALVAVYASSGLSLYLARKR   502
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                              GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGVNIPSIAALLAVYTASGLSLYLAKKR   502
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-amy*            GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGVNIPSIAALLAVYTASGLSLYLAKKR   502
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                                GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
A. amylolyticus DSM15939-Amy                                 GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                                 GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy           GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
A. salavatliensis DSM22626-Amy                               GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
Anoxybacillus sp. A321-Amy                                   GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                                 GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                                  GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                                 GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                                  GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
A. gonensis NCIMB13933-Amy                                   GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                                  GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
A. thermarum DSM17141-Amy                                    GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                                 GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                                GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
A. mongoliensis MB4-Amy*                                     GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALLAVYTASGLSLYFARKR   502
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                                 GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALVVVYTASGLSLYFARKR   502
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*                             GLLVGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALVAVYTASGLSLYFARKR   502
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy                             GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALVAVYTASGLSLYFARKR   502
A. flavithermus DSM2641-Amy                                  GLLAGDLVRSKDGKYDIILDRETAEIYVLAPKTGLNIPSIAALVAVYTPSGLSLYFARKR   502
A. tepidamans PS2-Amy*                                       GLLAGDLVRSDKNGYDIISNRETAEVYVLAKKTGLNVPSIAALVAVYVLSGLSLYYLKKR   505
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*                           GFLLDDLVRGDGDGYDLVLDRETAEVYKLREKTGINVSSIAAIVSVCVLSLLSLYLVKKR   505
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                                 GLLSGDLVRSSKNGYNLISDRETAEIYVLAKKTGLNIPSIAALIA YVLSGLSLYYAKKR   505
```

Şekil 5.20. (devam)

```
Anoxybacillus sp. BCO1-Amy*                          ------------------------------------------------------------   416
A. pushchinoensis DSM12423-Amy*                      KRS*---------------------------------------------------------   505
A. suryakundensis DSM27374-Amy*                      KA*----------------------------------------------------------   504
A. flavithermus subsp. yunnanensis KCTC13759-Amy*    KV*----------------------------------------------------------   504
Anoxybacillus sp. GXS-BL-Amy*                        KAS*---------------------------------------------------------   505
A. amylolyticus DSM15939-Amy                         KAS*---------------------------------------------------------   505
Anoxybacillus sp. DT3-1-Amy*                         KAS*---------------------------------------------------------   505
A. kamchatkensis subsp. asaccharedens DSM18475-Amy   KA*----------------------------------------------------------   504
A. salavatliensis DSM22626-Amy                       KA*----------------------------------------------------------   504
Anoxybacillus sp. A321-Amy                           KA*----------------------------------------------------------   504
Anoxybacillus sp. E184aa-Amy                         KA*----------------------------------------------------------   504
Anoxybacillus sp. E208a-Amy                          KA*----------------------------------------------------------   504
Anoxybacillus sp. E184ab-Amy                         KA*----------------------------------------------------------   504
Anoxybacillus sp. A3210-Amy                          KA*----------------------------------------------------------   504
A. gonensis NCIMB13933-Amy                           KA*----------------------------------------------------------   504
Anoxybacillus sp. D222b-Amy                          KA*----------------------------------------------------------   504
A. thermarum DSM17141-Amy                            KA*----------------------------------------------------------   504
A. ayderensis NCIMB13972-Amy                         KA*----------------------------------------------------------   504
A. kamchatkensis DSM14988-Amy                        KA*----------------------------------------------------------   504
A. mongoliensis MB4-Amy*                             KA*----------------------------------------------------------   504
Anoxybacillus sp. SK3-4-Amy*                         KAS*---------------------------------------------------------   505
Anoxybacillus sp. KU2-6(11)-Amy*                     KA*----------------------------------------------------------   504
A. kestanbolensis NCIMB13971-Amy                     KA*----------------------------------------------------------   504
A. flavithermus DSM2641-Amy                          KAS*---------------------------------------------------------   505
A. tepidamans PS2-Amy*                               SKRAA*-------------------------------------------------------   510
A. geothermalis ATCC BAA-2555-Amy*                   AKRMPE*------------------------------------------------------   511
Anoxybacillus sp. P3H1B-Amy*                         AKRSR*-------------------------------------------------------   510
```

Şekil 5.20. (devam)

Tüm α-amilaz amino asit dizilerinin hizalandığı Şekil 5.20'de görüldüğü üzere; β4 iplikçiğinde (CSR-II) katalitik nükleofil aspartik asit (Asp213), β5 iplikçiğinde (CSR-III) proton donörü glutamik asit (Glu242) ve β7 iplikçiğinde (CSR-IV) enzim geçiş-durumu stabilizatörü olan ikinci korunmuş aspartik asit (Asp310) olmak üzere aktif bölgeyi oluşturan ve tüm α-amilaz ailesinde korunmuş bu katalitik üçlü yapının varlığı ortaya konulmuştur (tüm amino asit numaralandırmaları E184aa protein dizisine göre yapılmıştır). Bu sonuçlar, korunmuş domain araştırma sonuçlarını da destekler niteliktedir. β4 iplikçiğinde (CSR-II) yine tüm α-amilaz ailesinde bulunan ve katalitik aktivite için gerekli olan korunmuş, değişmeyen arjinin (Arg211) amino asiti yer almaktadır. Tüm α-amilaz ailesinde korunmuş olmamakla birlikte, substrat bağlanmasında ve enzim geçiş durumunun stabilizasyonunda önemli olan His140 ve His309 fonksiyonel histidin köklerinin (32, 242), sırasıyla β3 (CSR-I) ve β7 (CSR-IV) iplikçiklerinde; tamamen korunmuş olan Arg211 kökü ile hidrojen bağı oluşturduğundan aktif bölgenin bütünlüğü için gerekli olan korunmuş Asp135 kökünün (262) ise tüm dizilerin β3 iplikçiğinde (CSR-I) yer aldığı görülmektedir. Ayrıca, yapısal olarak önemli oldukları bilinen β2 (CSR-VI) iplikçiğindeki korunmuş Gly80 ve Pro88 köklerinin yanı sıra β8 (CSR-VII) iplikçiğindeki korunmuş Gly341 kökünün (242, 257) varlığı da tespit edilmiştir.

Tüm α-amilaz dizilerinde Ca1, Ca2, Ca3 ve Ca4 olmak üzere dört kalsiyum bağlanma bölgesi (261) bulunmaktadır. Ca1 bölgesi ile etkileşime giren Asn139 (CSR-I), Glu173, Asp182 (CSR-V) ve His217 (CSR-II) olmak üzere dört korunmuş amino asit kökünün; Ca2 bölgesinde ise tüm dizilerde korunmuş olan Asn44, Asp50, Gly63 ve Asp65'in yanı sıra *Anoxybacillus* sp. P3H1B amilazı (Ser51) dışında korunmuş Asn49 ve *A. tepidamans*, *A. geothermalis* ve *Anoxybacillus* sp. P3H1B amilazları (Asp48) dışında korunmuş olan Asn46 amino asit köklerinin varlığı belirlenmiştir. Ca3 bölgesinde Asn92 (Thr94/*Anoxybacillus* sp. P3H1B), Glu109 (Asp111/*A. tepidamans*, *A. geothermalis* ve *Anoxybacillus* sp. P3H1B) ve Glu110 (Pro112/*A. tepidamans*, *A. geothermalis* ve *Anoxybacillus* sp. P3H1B); Ca4 bölgesinde ise Glu283 (Arg285/*A. geothermalis*, Ala285/*Anoxybacillus* sp. P3H1B) ve Glu400 (Lys400/*Anoxybacillus* sp. BCO1) kökleri bulunmaktadır.

Kalsiyum bağlanma bölgelerinin dışında, tüm α-amilaz dizilerinde substrat bağlanmasında rol oynadığı öne sürülen amino asit kökleri (261) de tespit edilmiştir. Buna göre, maltoz bağlanma bölgeleri olarak; 1) β1 ipliğinde Phe36, 2) CSR-VI'da Trp85

(Arg87/*Anoxybacillus* sp. P3H1B), 3) CSR-VI'nın downstream bölgesinde His98, Tyr100 ve Trp101 (sırasıyla Gln100, Lys102 ve Lys103/*Anoxybacillus* sp. P3H1B), 4) CSR-I'de His140, 5) CSR-V'in upstream bölgesinde Tyr143 (Pro145/*A. tepidamans*; Ser145/*Anoxybacillus* sp. P3H1B), Trp166, Phe178 (Tyr180/*A. tepidamans/A. geothermalis*; Asn180/*Anoxybacillus* sp. P3H1B), 6) CSR-II'de Arg211 (Tyr213/*Anoxybacillus* sp. P3H1B), Asp213, Thr214 (Ala216/*A. tepidamans*; Asp216/*Anoxybacillus* sp. P3H1B) ve His217, 7) CSR-III'de Glu242 ve Trp244 (sırasıyla Gly244 ve Asp246/*Anoxybacillus* sp. P3H1B), 8) CSR-IV'de His309 ve Asp310 (sırasıyla Asp311 ve Arg312/*Anoxybacillus* sp. P3H1B), 9) CSR-VII'de Ile344 ve Tyr346, 10) CSR-VII'nin downstream bölgesinde Asp358 ve Arg362 (sırasıyla Ala360 ve His364/*Anoxybacillus* sp. P3H1B) bulunmaktadır.

A. flavithermus subsp. *yunnanensis* KCTC 13759 referans dizisi dışında, tüm α-amilaz dizilerinde, katalitik $(\beta/\alpha)_8$-fiçı domain yapısının α3 heliksinde CSR-V ve CSR-II bölgeleri arasında yer alan, 200. ve 201. amino asit pozisyonlarındaki iki ardışık triptofan (WW) kökünün varlığı dikkat çekmektedir. Tüm dizilerde, B-domainin C-terminaline yakın olan CSR-V bölgesinde LPDLA dizilerinin (374, 375) korunmuş olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, Şekil 5.20'de de görüldüğü üzere, 27 α-amilaz dizisinin yaklaşık 30 amino asit uzunluğundaki C-terminal bölgesinde, 5 korunmuş fenilalanin ve tirozin aromatik amino asit kökleri mevcuttur. Mok ve ark. (376) ile Janeček ve ark. (246) tarafından C-terminal bölgesinde varlığı bildirilen Phe481, Tyr489 (Cys492/*A. geothermalis*), Phe492, Phe495 ve Tyr497 korunmuş aromatik amino asit motiflerine ek olarak tüm dizilerde Tyr457 ve Tyr469 köklerinin de korunmuş olduğu görülmüştür.

Tüm α-amilaz amino asit dizileri arasından sadece referans olarak kullanılan *A. tepidamans* PS2, *A. geothermalis* ATCC BAA-2555 ve *Anoxybacillus* sp. P3H1B'nin dizileri oldukça farklılık gösterip, ilk korunmuş dizi bölgesi olan CSR-VI bölgeleri Gly80 yerine Gly82 amino asiti ile başlamaktadır. Bu üç farklı dizinin dışında, toplam 504 amino asit uzunluğundaki E184aa, E208a, E184ab, D222b, A3210, A321, *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens, A. salavatliensis, A. gonensis, A. thermarum, A. ayderensis, A. kamchatkensis, A. mongoliensis* MB4, *Anoxybacillus* sp. KU2-6 (11) ve *A. kestanbolensis* α-amilaz dizilerindeki 504. alanin (A) sonrası stop kodonu Ochre (TAA) iken, 505 aminoasitten oluşan *A. flavithermus, A. amylolyticus, Anoxybacillus* sp. GSX-BL, DT3-1 ve SK3-4 dizilerinde Alanin (Ala504) ve ilave bir Serin (Ser505) amino asit kökü sonrasında Opal (TGA) stop kodonu yer almaktadır. Bunun dışında, 504 amino asit

uzunluğundaki *A. suryakundensis* dizisinde Ala504 kökünden sonra stop kodonu olarak Opal (TGA), 505 amino asitli *A. pushchinoensis* dizisinde ise Ser505 sonrası Ochre (TAA) bulunmaktadır.

Tez kapsamında elde edilen olası *A. rupiensis* ve *A. caldiproteolyticus* siklodekstrin glukanotransferaz (CGTaz) amino asit dizileri ve bu dizilere en çok benzerlik gösteren 3 referans dizi ile birlikte toplam 5 CGTaz dizisi, 711 amino asitlik *A. rupiensis* CGTaz'ına göre ve CSR-VI bölgesinin (Gly98 ile başlayan β_2 iplikçiği) başlangıcından CSR-VII bölgesinin (Thr389 ile biten β_8 iplikçiği) sonuna kadar uzanan dizileri kapsayacak şekilde hizalanmıştır. Hizalama sonucunda, GH13 enzim ailesinin üyesi olan CGTaz'ların protein dizilerinde de 7 korunmuş dizi bölgesinin varlığı tespit edilmiş ve CSR I-VII bölgeleri, aktif/katalitik bölgeler, substrat ve kalsiyum bağlanma bölgeleri ve CGTaz'lar için karakteristik amino asitler işaretlenerek Şekil 5.21'de sunulmuştur. Korunmuş dizi bölgelerinin sınırları, *B. circulans* 8 suşunun CGTaz'ının bilinen CSR bölgelerinin sınırlarına (257, 331) göre belirlenmiştir.

```
A. rupiensis DSM17127-Cgt                        ----------------------------------------------------MKRWLSV   7
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*             ----------------------------------------------------MKRWLSV   7
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                      ----------------------------------------------------MKRWLSV   7
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt               ------------------------------------------------------------  0
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*            ----------------------------------------------------MRRWLSL   7

                                                                                                  Ca2
                                                                                                 * *  *
A. rupiensis DSM17127-Cgt                        VL-SMSLVFS---AFFLVSDTQKVTVEAAGNLNKVNF--TSD-IVYQIVVGRFVDGNTSN   60
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*             VL-SMSLVFS---AFFLVSDTQKVTVEAAGNLNKVNF--TSD-IVYQIVVDRFVDGNTSN   60
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                      VL-SMSLVFS---AFFLVSDTQKVTVEAAGNLNKVNF--TSD-IVYQIVVDRFVDGNTSN   60
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt               ------------------------------------------------------------   0
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*            VL-SMSFVFS---AIFIVSDTQKVTVEAAGNLNKVNF--TSD-VVYQIVVDRFVDGNTSN   60

                                                                                   β2
                                                 Ca2                  Ca2                CSR-VI
                                                 *                     * *                 !  !
A. rupiensis DSM17127-Cgt                        NPSGSL-FSSGCTNLRKYCGGDWQGIIN----KINDGYLTEMGVTAIWISQPVENVFDVM   115
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*             NPSGSL-FSSGCTNLRKYCGGDWQGIIN----KINDGYLTEMGVTAIWISQPVENVFAVM   115
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                      NPSGSL-FSSGCTNLRKYCGGDWQGIIN----KINDGYLTEMGVTAIWISQPVENVFAVM   115
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt               -------FSSKCTNLRKYCGGDWQGIIN----KINDGYLTDMGVTAIWISQPVENVFSVM   49
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*            NPSGAL-FSSGCTNLRKYCGGDWQGIIN----KINDGYLTDMGVTAIWISQPVENVFSVM   115
```

Şekil 5.21. Tez kapsamında elde edilen olası siklodekstrin glukanotransferaz (CGTaz) amino asit dizileri (Cgt) ile karşılaştırma amacıyla kullanılan referans CGTaz enzimlerinin (Cgt*) amino asit dizi hizalaması ve korunmuş dizi bölgeleri (CSR: conserved sequence region). Renk kodlaması: katalitik aspartatlar ve glutamat (katalitik üçlü)- kırmızı (*); fonksiyonel histidinler- açık mavi; değişmeyen arjinin- pembe (#); çok iyi korunmuş aspartat- yeşil; Ca^{+2}-bağlanma bölgeleri (Ca1-*; Ca2-*)- turuncu; maltoz bağlanma bölgeleri (MBS1- Δ, MBS2- Δ ve MBS3- Δ)- kahverengi; yapısal olarak önemli amino asit kökleri: glisin- mor ve prolin- koyu sarı; CSR bölgelerindeki CGTaz'lar için karakteristik amino asit kökleri (!): W, F- turkuaz; Q- gri; A, P-koyu sarı; I, L- açık yeşil; N- koyu kırmızı; G- mor; CSR bölgeleri dışındaki korunmuş ve CGTaz'lara özgü amino asit kökleri-lacivert; korunmuş amino asit kökleri- sarı. Korunmuş olmayan amino asit kökleri renklendirilmemiştir.

```
                                                                                                β3
                                                                                              CSR-I
                                                                                                   Ca I
                                                                                             !!!*
A. rupiensis DSM17127-Cgt                    NDADGSTSYHGYWARDFKKTN--------PFFGTLSDFQRLVDAAHAKGIKVIIDFAPNH   167
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         NDADGSTSYHGYWARDFKKTN--------PFFGTLSDFQRLVDAAHAKGIKVIIDFAPNH   167
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  NDADGSTSYHGYWARDFKKTN--------PFFGTLSDFQRLVDAAHAKGIKVIIDFAPNH   167
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt           NDASGSTSYHGYWARDFKKPN--------PFFGTLSDFQRLVDAAHAKGIKVIIDFAPNH   101
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        NDASGSASYHGYWARDFKKPN--------PFFGTLSDFQRLVDAAHAKGIKVIIDFAPNH   167

A. rupiensis DSM17127-Cgt                    TSPASETNPSYMENGRLYDNGTLIGGYTNDTNSYFHHNGGTTF----------S-NLEDG   216
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         TSPASETNPSYMENGRLYDNGTLIGGYTNDTNSYFHHNGGTTF----------S-NLEDG   216
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  TSPASETNPSYMENGRLYDNGTLIGGYTNDTNSYFHHNGGTTF----------S-NLEDG   216
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cg            TSPASETNPSYMENGRLYDNGTLLGGYTNDANMYFHHNGGTTF----------S-SLEDG   150
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        TSPASETNPSYMENGRLYDNGTLLGGYTNDANMYFHHNGGTTF----------S-SLEDG   216

                                                   loop3                                β4
                                                   CSR-V                              CSR-II

                                             Ca1         Ca1                                Ca1
                                             *            * !                        !# *    *
A. rupiensis DSM17127-Cgt                    I-Y--RNLFDLADFNHQNQFIDKYLKDAIKLWLD-MGIDGIRMDAVKHMPFGW-------   265
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         I-Y--RNLFDLADFNHQNQFIDKYLKDAIKLWLD-MGIDGIRMDAVKHMPFGW-------   265
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  I-Y--RNLFDLADFNHQNQFIDKYLKDAIKLWLD-MGIDGIRMDAVKHMPFGW-------   265
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt           I-Y--RNLFDLADLNHQNPVIDRYLKDAVKMWID-MGIDGIRMDAVKHMPFGW-------   199
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        I-Y--RNLFDLADLNHQNPVIDRYLKDAVKMWID-MGIDGIRMDAVKHMPFGW-------   265
```

Şekil 5.21. (devam)

```
                                                                                  β5
                                                                               CSR-III
                                                                                 !*! !
A. rupiensis DSM17127-Cgt                    --------------------QKSFMDEVYDYRP-VFTFGEWFLSENEVDSNNHFFA---N   301
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         --------------------QKSFMDEVYDYRP-VFTFGEWFLSENEVDSNNHFFA---N   301
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  --------------------QKSFMDEVYDYRP-VFTFGEWFLSENEVDSNNHFFA---N   301
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt           --------------------QKSLMDEIDNYRP-VFTFGEWFLSENEVDANNHYFA---N   235
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        --------------------QKSLMDEIDNYRP-VFTFGEWFLSENEVDANNHYFA---N   301

A. rupiensis DSM17127-Cgt                    ESGMSLLDFRFGQKLRQVLRNNSDDWYGFN---------------QMIQDTASAYDEVID   346
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         ESGMSLLDFRFGQKLRQVLRNNSDDWYGFN---------------QMIQDTASAYDEVID   346
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  ESGMSLLDFRFGQKLRQVLRNNSDDWYGFN---------------QMIQDTASAYDEVID   346
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt           ESGMSLLDFRFGQKLRQVLRNNSDNWHGFN---------------QMIQDTASAYDEVLD   280
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        ESGMSLLDFRFGQKLRQVLRNNSDNWYGFN---------------QMIQDTASAYDEVLD   346

                                                β7                                        β8
                                             CSR-IV                                    CSR-VII
                                             !   !   *
A. rupiensis DSM17127-Cgt                    QVTFLDNHDMDRF-----MADE-----GDPRKVDIALAVLLTSRGVPNIYYGTEQYMTGN   396
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         QVTFLDNHDMDRF-----MADE-----GDPRKVDIALAVLLTSRGVPNIYYGTEQYMTGN   396
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  QVTFLDNHDMDRF-----MVDE-----GDPRKVDIALAVLLTSRGVPNIYYGTEQYMTGN   396
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt           QVTFLANHDMDRF-----MID----------------------------------------   296
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        QVTFLDNHDMDRF-----MIDG-----GDPRKVDMALAVLLTSRGVPNIYYGTEQYMTGN   396
```

Şekil 5.21. (devam)

```
A. rupiensis DSM17127-Cgt                    GDPN------NRKMMTSFNKN----------------------------------------   411
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         GDPN------NRKMMTSFNKN----------------------------------------   411
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  GDPN------NRKMMTSFNKN----------------------------------------   411
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt           ------------------------------------------------------------   296
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        GDPN------NRKMMSSFNKN----------------------------------------   411

A. rupiensis DSM17127-Cgt                    ------------------------------TRAYQVIQKLSSLRRSNPALSYGDTE----   437
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         ------------------------------TRAYQVIQKLSSLRRSNPALSYGDTE----   437
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  ------------------------------TRAYQVIQKLSSLRRSNPALSYGDTE----   437
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt           ------------------------------------------------------------   296
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        ------------------------------TRAYQVIQKLSSLRRNNPALAYGDTE----   437

                                             MBS3                                   MBS3
                                             Δ  ΔΔ                                  Δ
A. rupiensis DSM17127-Cgt                    --QRWINS--DVYIYE----RQFGKDVVLVAVNRSLSKSYSITGLFTALPSGTYTDQ-LG   488
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         --QRWINS--DVYIYE----RQFGKDVVLVAVNRSLSKSYSITGLFTALPSGTYTDQ-LG   488
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  --QRWINS--DVYIYE----RQFGKDVVLVAVNRSLSKSYSITGLFTALPSGTYTDQ-LG   488
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt           ------------------------------------------------------------   296
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        --QRWING--DVYVYE----RQFGKDVVLVAVNRSSSSNYSITGLFTALPAGTYTDQ-LG   488

A. rupiensis DSM17127-Cgt                    ALLDGNTIQVGSNGAVNAFNLGPGEVGVWTYSAAESVPIIGHIGPMMGQVGHKLTIDGEG   548
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         ALLDGNTIQVGSNGAVNAFNLGPGEVGVWTYSAAESVPIIGHIGPMMGQVGHKLTIDGEG   548
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  ALLDGNTIQVGSNGAVNAFNLGPGEVGVWTYSAAESVPIIGHIGPMMGQVGHKLTIDGEG   548
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt           ------------------------------------------------------------   296
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        GLLDGNTIQVGSNGSVNAFDLGPGEVGVWAYSATESTPIIGHVGPMMGQVGHQVTIDGEG   548
```

Şekil 5.21. (devam)

```
A. rupiensis DSM17127-Cgt                    FGTNVGTVKFGNTVASVVSWSNNQITVTVPNIPAGKYNITVQTSGGQVSAAYDNFEVLTN   608
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         FGTNVGTVKFGNTVASVVSWSNNQITVTVPNIPAGKYNITVQTSGGQVSAAYDNFEVLTN   608
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  FGTNVGTVKFGNTVASVVSWSNNQITVTVPNIPAGKYNITVQTSGGQVSAAYDNFEVLTN   608
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt           ------------------------------------------------------------   296
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        FGTNTGTVKFGTTAANVVSWSNNQIVVAVPNVSPGKYNITVQSSSGQTSAAYDNFEVLTN   608

                                                   MBS2          MBS1        MBS2   MBS2
                                             ΔΔ  Δ  Δ            Δ           ΔΔ     Δ  Δ
A. rupiensis DSM17127-Cgt                    DQVSVRFVVNNANTNWGENVYLVGNVHELGNWNTSKAIGPLFNQVIYSYPTWYVDVSVPE   668
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         DQVSVRFVVNNANTNWGENIYLVGNVHELGNWNTSKAIGPLFNQVIYSYPTWYVDVSVPE   668
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  DQVSVRFVVNNANTNWGENVYLVGNVHELGNWNTSKAIGPLFNQVIYSYPTWYVDVSVPE   668
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt           ------------------------------------------------------------   296
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        DQVSVRFVVNNATTNLGQNIYIVGNVYELGNWDTSKAIGPMFNQVVYSYPTWYIDVSVPE   668

                                                 MBS1          MBS1
                                                 Δ            ΔΔ    Δ
A. rupiensis DSM17127-Cgt                    GKTIEFKFIKKDRSGNVIWESGSNHVYTTPTSTTGTVNVNWQY*   711
B. stearothermophilus ET1 bscgt-Cgt*         GKTIEFKFIKKDGSGNVIWESGSNHVYTTPTSTTGTVNVNWQY*   711
Anoxybacillus sp. B2M1-Cgt*                  GKTIEFKFIKKDGSGNVIWESGSNHVYTTPTSTTGTVNVNWQY*   711
A. caldiproteolyticus DSM15730-Cgt           ---------------------------------------------   296
B. stearothermophilus NO2 cgt232-Cgt*        GKTIEFKFIKKDSQGNVTWESGSNHVYTTPTNTTGKIIVDWQN-   711
```

Şekil 5.21. (devam)

Tüm CGTaz amino asit dizilerinin hizalandığı Şekil 5.21'de görüldüğü üzere; dizilerde CGTaz'larda tamamen korunmuş olan tüm katalitik amino asit köklerinin (32) varlığı ortaya konulmuştur. Bunlar, aktif bölgeyi oluşturan katalitik nükleofil Asp256 (β4, CSR-II), genel asit katalizörü (proton donörü) Glu284 (β5, CSR-III) ve enzim geçiş-durumu stabilizatörü olan Asp355 (β7, CSR-IV) köklerinden oluşan katalitik Asp-Glu-Asp üçlüsü (266); β4 iplikçiğinde (CSR-II) korunmuş, değişmeyen ve nükleofilin konumlanması için gerekli arjinin (Arg254) kökü (266); substrat bağlanmasında ve enzim geçiş durumunun stabilizasyonunda önemli olan, sırasıyla β3 (CSR-I) ve β7 (CSR-IV) iplikçiklerinde yer alan korunmuş His167 ve His354 fonksiyonel histidin kökleri (266, 377); β3 (CSR-I) iplikçiğinde yer alan, katalitik bölgeye yakın olduğu bilinen ve oldukça korunmuş Asp162 kökü; substrat bağlanmasında yer alan ve bir kalsiyum ligandı olarak rol oynayan His260 kökü (289, 378) ve yine bir kalsiyum ligandı olan Asn166 köküdür (289) (tüm amino asit numaralandırmaları *A. rupiensis* CTGaz dizisine göre yapılmıştır). Bu sonuçlar, korunmuş domain araştırma sonuçlarını da destekler niteliktedir. Ayrıca, kalsiyum bağlanma bölgesi (Ca2) için yapısal destek görevi gördükleri düşünülen CSR-VI'nın upstream bölgesindeki Gly56, Pro62 ve Gly64 köklerinin yanı sıra yapısal olarak önemli oldukları bilinen CSR-VI'da Gly98, Pro107 ve CSR-VII'daki Gly381 köklerinin (32) varlığı da tespit edilmiştir.

Korunmuş domain arama çalışmalarında CGTaz dizilerinde Ca^{+2} bağlanma bölgesinde 5 amino asit kökünün varlığı (Çizelge 5.15) tespit edilmiş olmasına karşın, dizilerde *B. circulans* 251 (289) ve *B. circulans* 8 CGTaz (286) yapısında yer aldığı bilinen, Ca1 ve Ca2 olmak üzere 2 ayrı kalsiyum bağlanma bölgesi tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular, CDS tarama sonuçlarını desteklemekle birlikte literatürde bilinen CGTaz kristal yapılarındaki Ca^{+2} bağlanma bölgelerinin daha detaylı incelenmesi ile dizilerde ilave amino asit kökleri belirlenmiş ve Şekil 5.21'de gösterilmiştir. Buna göre; Ca1 bölgesinde kalsiyum iyonu ile etkileşime giren, korunmuş Asn166 (CSR-I), Ile217, Asp226 (CSR-V) ve His260 (CSR-II) kökleri ile Ca2 bölgesinde α-amilazların yapısında bulunmayan sadece CGTaz'lara özgü olan ve A domainin β1 tabakası ve α1 heliksi ile bağlantılı loop bölgesinde yer alan korunmuş Asp55, Asn57, Asn60, Asn61, Gly79 ve Asp81 köklerinin varlığı belirlenmiştir (286, 289).

Korunmuş domain arama çalışmalarında CGTaz dizilerinde tespit edilen 2 maltoz bağlanma bölgesine (MBS-1 ve 2) (Çizelge 5.15) ek olarak, dizilerde *B. circulans* 251 CGTaz'ının (289) C domaininde bulunan üçüncü bir maltoz bağlanma bölgesi (MBS3) ve

tüm MBS bölgelerinde maltozun bağlandığı/etkileşim gösterdiği amino asit kökleri belirlenmiştir. MBS1 ve MBS2 bölgeleri E domainde yer alırken, MBS3 bölgesi C-domainde yer almaktadır. MBS1 bölgesinde maltozun hidrofobik etkileşimlerle bağlanmasını sağlayan asıl Trp640 ve Trp687 ile maltozla hidrojen bağı yapan Lys675, Glu688 ve Asn692 kökleri bulunmaktadır. MBS2 bölgesinde, maltozu fenil halkası ile bağlayan Tyr657 ve maltozla hidrojen bağı yapan Thr622, Asn623 (*B. circulans* 251 CGTaz/Ala599 yerine), Gly625, Asn627, Asn651, Gln652 ve Trp660 kökleri yer almaktadır. MBS3 bölgesinde ise aromatik yan-zinciri ile maltozun bağlanmasını sağlayan Trp440 ile maltozla hidrojen bağı yapan Gln438 (*B. circulans* 251 CGTaz/Glu411 yerine), Ile441 ve Gly473 köklerinin varlığı belirlenmiştir. Ayrıca, CGTaz'ların E-domainlerinde yer alan ve tamamen korunmuş olan MBS2'deki Asn627 ve MBS1'deki Trp640 arasında yer alan Gly632, Leu637 ve Gly638 kökleri ile MBS2'deki Tyr657'den sonra gelen Pro658 kökünün ham nişasta bağlanma domainin yapısal desteği için gerekli olduğu öne sürülmüştür (289).

Şekil 5.21'de de görüldüğü üzere, CGTaz dizilerinde CSR bölgelerinde tespit edilen CGTaz'lar için karakteristik amino asit kökleri:

a) CSR-VI'da (β2 iplikçiği) korunmuş Pro107 kökünün *n*-1 pozisyonunda yer alan Gln106 (*QP* dizi motifi) ile *n*-4 pozisyonundaki Trp103 kökleri (242, 257),

b) CSR-I'de (β3 iplikçiği) korunmuş Asn166 ve His167 amino asitlerinin önünde yer alan Pro165 kökü (*PNH* dizi motifi); $Ala_{164}Pro_{165}$ ya da nadiren $Thr_{164}Pro_{165}$ dizisi; değişmeyen, tamamen korunmuş Asp162 kökünün ardından gelen tipik bir hidrofobik aromatik amino asit, fenilalanin (Phe163) ya da tirozin (*K. pneumoniae*'da) kökü (257, 276, 331, 332),

c) CSR-V'de (loop3) Asn228 kökü (257),

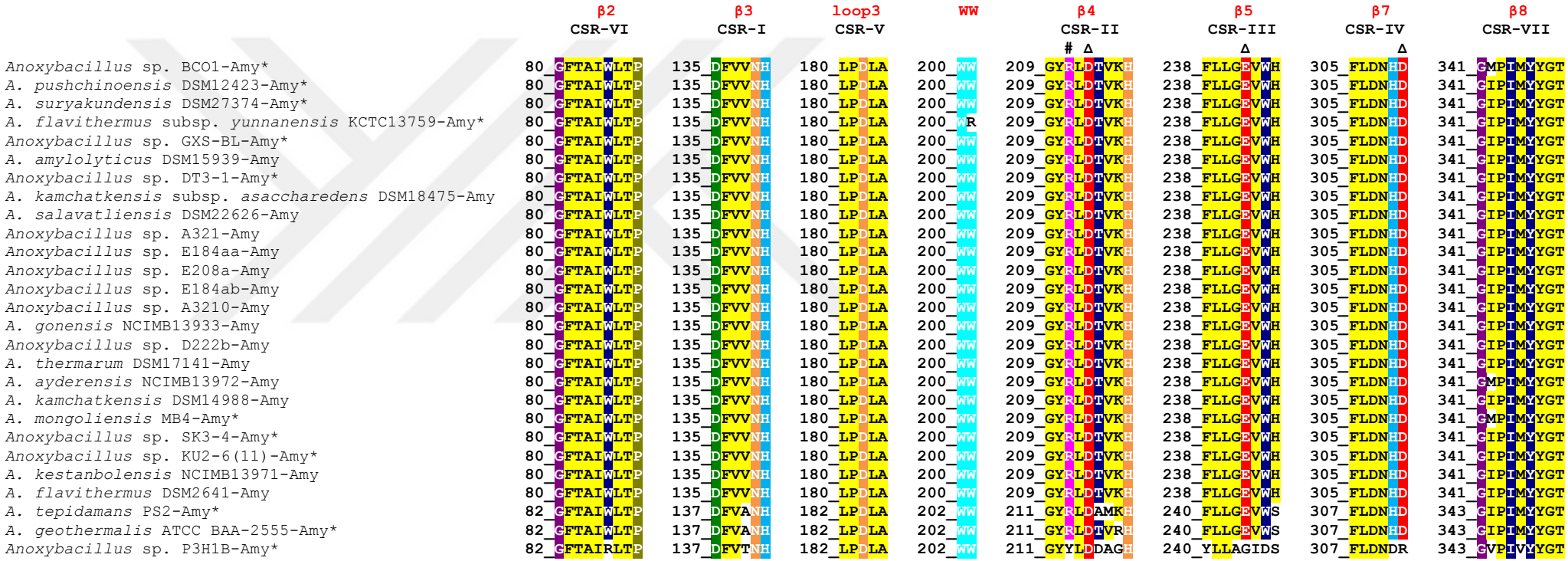
d) CSR-II'de (β4 iplikçiği) değişmeyen, tamamen korunmuş Arg254 kökünün önünde yer alan Ile253 kökü (257, 331),

e) CSR-III'de (β5 iplikçiği) korunmuş, katalitik glutamik asit (Glu284, proton donörü) kökünü takip eden Gly283 kökü (*GE* dizi motifi); Glu284 kökünün *n*+1 ve *n*+3 pozisyonlarında sırasıyla yer alan, tamamen korunmuş Trp285 ve Leu287 kökleri (32, 257, 331),

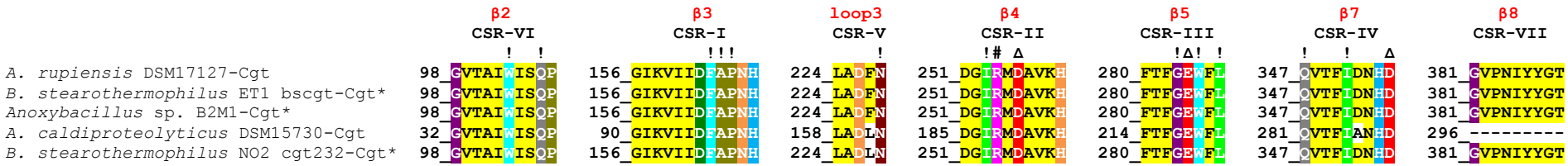
f) CSR-IV'de (β7 iplikçiği) korunmuş Phe350 amino asitinden sonra gelen Ile/Leu351 kökü ile β7 iplikçiğinin başlangıcında yer alan Gln/Met347 köküdür (257, 331, 332).

Bunların dışında, CGTaz'larda CSR-III'de yer alan katalitik Glu284 amino asitinin *n*+2 pozisyonunda fenilalanin ya da tirozin kökü (Phe286/Tyr286) yer alır. Glu284 kökünden sonra gelen $Trp_{285}Phe_{286}$ dizi motifi CGTaz'larda korunmuş olup, α-amilaz ailesinin diğer üyelerinde bulunmaz ve CGTaz'ların katalizledikleri siklizasyon reaksiyonlarında önemli oldukları bilinmektedir (32). CSR-II'deki $Lys_{259}His_{260}$ dizisi, α-amilaz ailesinde korunmuştur ve substrat bağlanmasında rol oynar. Lys259 amino asit kökü, hidrojen bağlanmasını sağlayarak +2 alt bölge konformasyonunun stabil olmasına katkı yapmakta ve His260 kökünün katalitik etkisi için gerekli olup CGTaz'ın katalizlediği tüm transglikolizasyon reaksiyonlarında yer almaktadır (379). CSR bölgeleri dışında tespit edilen korunmuş ve CGTaz'lara özgü amino asit kökleri ve dizi motifleri ise ***1)*** β1 iplikçiği ile α1 heliksi arasında yer alan tamamen korunmuş 55DG, 60NNP-G motifleri ile Leu74 ve Asp81, ***2)*** CSR-I'in upstream bölgesinde yer alan Ala129, Arg130 ve Thr135, ***3)*** CSR-I'in downstream bölgesinde yer alan Pro170, Tyr178, Glu180, Gly192, Tyr194, Asn196, Asp197, Phe202, His204 ve Gly207, Ser211, Ile217, Tyr218 ve 219-K/R, N, L, F/Y, D-223 dizi motifi (sadece Leu221 α-amilazlarda da bulunur), ***4)*** CSR-V ve II arasında yer alan Asp235, Tyr237, Ile242 ve Trp245, ***5)*** CSR-III'ün downstream bölgesinde yer alan Phe299, Gly304, Met305, Arg317, ***6)*** CSR-IV ve VII arasında yer alan Arg380 ile CSR-VII downstream bölgesinde yer alan Tyr392, Thr412, ***7)*** C-domaininde Gly434 ve Arg439, ***8)*** E-domaininde Gly632, Leu637, Gly638 ve Pro658'dir (32).

Tüm α-amilaz ve siklodekstrin gukanotransferaz enzim dizilerinin hizalanması sonucu elde edilen her bir korunmuş dizi bölgesi, sırasıyla Şekil 5.22a ve 5.22b'de sunulmuş ve CSR'lerde enzim katalizi ve substrat bağlanması için gerekli ve ilgili enzim için karakteristik olan amino asit kökleri gösterilmiştir.



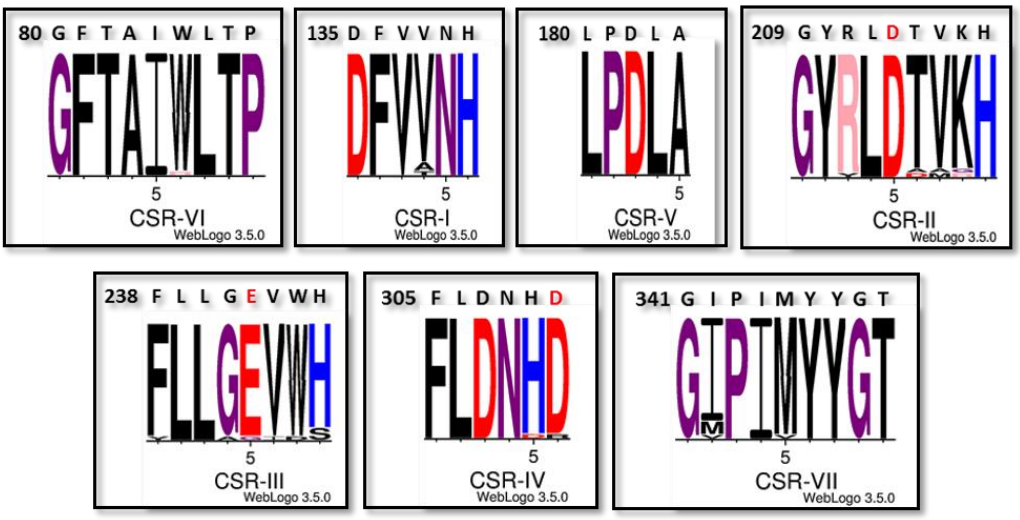
(a)



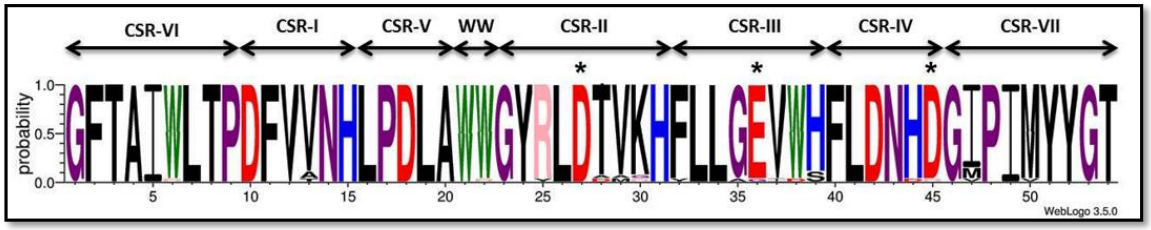
(b)

Şekil 5.22. **(a)** Tüm α-amilaz amino asit dizilerinin E184aa amilaz dizisine göre hizalanması sonucu elde edilen korunmuş dizi bölgeleri; **(b)** Tüm siklodekstrin gukanotransferaz (CGTaz) amino asit dizilerinin *A. rupiensis* DSM17127 CGTaz dizisine göre hizalanması sonucu elde edilen korunmuş dizi bölgeleri. * Bu çalışma kapsamında elde edilen amino asit dizileri; CSR: korunmuş dizi bölgesi. Renk kodlaması: katalitik aspartatlar ve glutamat (katalitik üçlü)- kırmızı (Δ); fonksiyonel histidinler- açık mavi; değişmeyen arjinin- pembe (#); çok iyi korunmuş aspartat- yeşil; Ca^{+2}-bağlanma bölgeleri-turuncu; yapısal olarak önemli amino asit kökleri, glisin- mor ve prolin- koyu sarı; korunmuş amino asit kökleri- sarı. α-Amilaz dizilerindeki iki ardışık triptofan- turkuaz; maltoz bağlanma bölgeleri-lacivert. CGTazlar için karakteristik amino asit kökleri (!): W, F- turkuaz; Q- gri; A, P-koyu sarı; I, L- açık yeşil; N- koyu kırmızı; G- mor. Korunmuş olmayan amino asit kökleri renklendirilmemiştir.

WebLogo 3.5.0 programı yardımıyla, sadece *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz çoklu hizalanmış amino asit dizileri kullanılarak, bu cinse özgü korunmuş dizi bölgelerinin tek tek ve toplu halde gösterildiği α-amilaz (Şekil 5.23a ve 5.23b) ve CGTaz (Şekil 5.24a ve 5.24b) dizi logoları oluşturulmuştur.

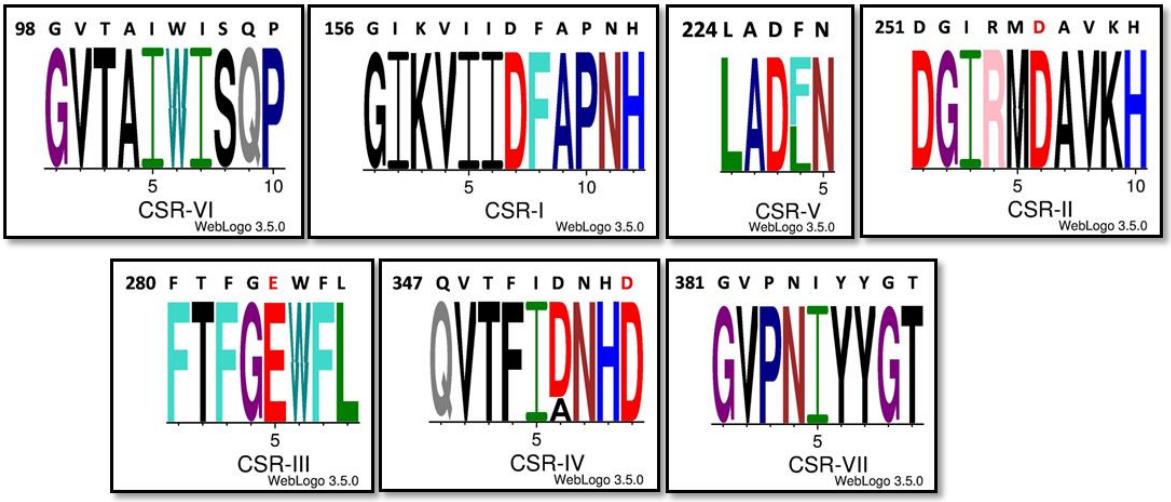


(a)

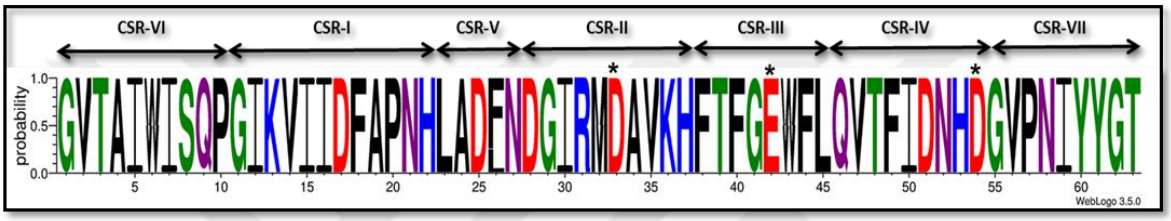


(b)

Şekil 5.23. *Anoxybacillus* cinsi α-amilaz amino asit dizilerinden elde edilen korunmuş dizi bölgelerinin **a)** tek tek ve **b)** topluca gösterildiği dizi logoları. CSR-I, 10-15. aa; CSR-II, 23-31. aa; CSR-III, 32-39. aa; CSR-IV, 40-45. aa; CSR-V, 16-20. aa; CSR-VI, 1-9. aa; CSR-VII, 46-54. aa. CSR-V ve CSR-II arasındaki karakteristik iki ardışık triptofan ile katalitik üçlü yapı (katalitik nükleofil-27. aa, aspartik asit; proton donörü-36. aa, glutamik asit ve enzim geçiş-durumu stabilizatörü- 45. aa, aspartik asit) da gösterilmiştir. Amino asit pozisyonları E184aa amilaz dizisine göre numaralandırılmıştır (aa: amino asit; *: aktif bölgedeki katalitik üçlü yapı).



(a)



(b)

Şekil 5.24. *Anoxybacillus* cinsi siklodekstrin gukanotransferaz amino asit dizilerinden elde edilen korunmuş dizi bölgelerinin **a)** tek tek ve **b)** topluca gösterildiği dizi logoları. CSR-I, 11-22. aa; CSR-II, 28-37. aa; CSR-III, 38-45. aa; CSR-IV, 46-54. aa; CSR-V, 23-27. aa; CSR-VI, 1-10. aa; CSR-VII, 55-63. aa. Katalitik üçlü yapı (katalitik nükleofil-33. aa, aspartik asit; proton donörü-42. aa, glutamik asit ve enzim geçiş-durumu stabilizatörü- 54. aa, aspartik asit) da gösterilmiştir. Amino asit pozisyonları *A. rupiensis* DSM17127 CGTaz dizisine göre numaralandırılmıştır (aa: amino asit; *: aktif bölgedeki katalitik üçlü yapı).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

6.1.1. E184aa VE E208a KODLU *ANOXYBACILLUS* CİNSİ İZOLATLARIN KLASİK, KEMOTAKSONOMİK VE GENOTİPİK ANALİZLERLE TÜR TEŞHİSLERİ

Tez çalışması kapsamında, E184aa ve E208a kodlu *Anoxybacillus* cinsi iki bakterinin *klasik taksonomik yöntemler* (hücre ve koloni morfolojisi, fizyolojik ve biyokimyasal testler), *kemotaksonomik analizler* (toplam hücre yağ asiti, kinon, polar lipid ve DAP analizleri) ve *genotipik analizler* (16S rRNA gen dizi analizi, 16S-ARDRA, ITS-PCR, $(GTG)_5$-PCR ve BOXA1-PCR genomik parmak izi analizleri, genomik DNA'nın % G+C içeriği ve DNA-DNA hibridizasyon çaprazlamaları) kullanılarak kısmi tür teşhisleri yapılmıştır.

Bu kapsamda 16S rRNA gen dizi verilerine göre yapılan filogenetik analizlerde, E184aa ve E208a izolatlarının her ikisi de en çok *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T, *A. salavatliensis* DSM 22626^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. ayderensis* NCIMB 13972^T ve *A. gonensis* NCIMB 13933^T referans türlerine % 97.0'nin üzerinde gen dizi benzerliği göstermiştir. Bunun yanı sıra, *A. thermarum* DSM 17141^T, *A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. mongoliensis* DSM 19169^T ve *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T referans türlerine her iki izolatın ya da birinin yaklaşık % 97.0 oranında 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Yeni bir bakteri türünün tanımlanmasında, < % 97.0 16S rRNA gen dizi benzerlik oranı eşik değer olarak kabul edilmektedir (5). Bu sebeple, 16S rRNA gen dizi analizleri sonrasında gerçekleştirilen tüm fenotipik, kemotaksonomik ve diğer genotipik analizlere belirtilen bu referans türler dahil edilmiştir.

ARDRA, ITS-PCR ve *Rep*-PCR gibi DNA parmak izi teknikleriyle *Anoxybacillus* cinsi bakterileri tür seviyesinde tanımlarken, referanslardan genomik farklılıklarının ortaya çıkarıldığı pek çok literatür mevcuttur (39, 82, 83, 205, 206). Bu çalışmada, 16S rRNA geninin *Alu*I, *Hae*III ve *Taq*I restriksiyon enzimleriyle ARDRA analizlerinin yanı sıra, ITS gen bölgesi ve tüm genomun tarandığı $(GTG)_5$ ile BOXA1 tekrar elementlerinin PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen bant profilleri, kümülatif kümeleme analizleriyle değerlendirildiğinde, E184aa ve E208a izolatlarının yakın akraba oldukları referans türlerden (> % 97.0 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren), özellikle *HaeIII*-ARDRA,

ITS-PCR ve $(GTG)_5$-PCR analizlerinde eşsiz bant profillerine sahip oldukları, filogenetik ağaçta birarada kümelenerek farklı bir dal oluşturdukları ve her iki izolatın da BOXA1-PCR profili yönünden birbirlerinden farklılık gösterdikleri görülmüştür.

Hücre ve koloni morfolojisi, fizyolojik ve biyokimyasal testleri kapsayan klasik taksonomik analizlerden elde edilen sonuçlara göre, E184aa ve E208a izolatlarının en çok 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdiği *A. salavatliensis* DSM 22626^T, *A. gonensis* NCIMB 13933^T, *A. ayderensis* NCIMB 13972^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T türlerinden ve birbirlerinden ayırt edilebildikleri temel karakteristik özellikler Çizelge 6.1'de özetlenerek sunulmuştur. Bu sonuçlara göre; izolatlar diğer 5 referans türden pH istekleri, sıcaklık ve tuz istekleri, hücre, koloni ve spor morfolojileri, katalaz, amilaz, oksidaz, ß-galaktosidaz aktiviteleri ve bazı şeker fermentasyon testleri yönünden farklılık göstermişlerdir. En çok birbirlerine 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren E184aa ve E208a izolatları, kendi içlerinde ise özellikle pH ve tuz istekleri, flagella tipleri ve endospor yapılarındaki spor şişkinliğinin yanı sıra, katalaz ve oksidaz aktiviteleri ile salisin ve arbutin kullanımları yönünden farklı karakterler sergilemişlerdir. Son olarak da E208a izolatı, en çok benzerlik gösterdiği E184aa ve diğer 5 referans türle kıyaslandığında, 30 µg kanamisine dirençli bulunmuştur.

Tanımlanmış tüm *Anoxybacillus* cinsi üyeleri arasında en yüksek ve en düşük DNA G+C içeriğine (% mol) sahip türler sırasıyla, 57 % mol oranı ile *A. gonensis* (72) ve 37.8 % mol içerikle *A. calidus* (71)'dur. DSMZ İdentifikasyon Servisi'nde yürütülen ve tür bazında ayırt edici analizler olarak bilinen kemotaksonomomik ve diğer detaylı genotipik testlerin sonuçlarına göre, E184aa ve E208a izolatlarının sırasıyla 41.9 ve 42.2 % mol olmak üzere *Anoxybacillus* cinsinin genel özelliklerini kapsayacak şekilde % G+C içeriğine sahip oldukları görülmüştür. Menakinon 7 (MK-7) *Anoxybacillus, Geobacillus, Aeribacillus* ve *Caldibacillus* gibi birçok termofilik basil grubu bakterilerin hücre zarında yaygın olarak bulunmaktadır (80). *Anoxybacillus* cinsinin hücre zarında bulunan major menakinon MK-7 olup, *A. amylolyticus, A. thermarum, A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens, A. salavatliensis, A. calidus, A. tengchongensis, A. eryuanensis, A. vitaminiphilus* ve *A. kaynarcensis* türlerinde tespit edilmiştir (16, 71, 77, 79, 80-82, 153). E184aa (% 94) ve E208a (% 96) izolatlarında da dominant menakinon MK-7 olarak saptanmış ve eser miktarlarda MK-5 ve MK-6 içerdikleri görülmüştür (Çizelge 6.1).

Çizelge 6.1. E184aa ve E208a izolatlarının ve en çok 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdikleri referans türlerin ayırt edici özellikleri [Bu tablodaki morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin tamamı tez kapsamında çalışılmıştır. *: Sadece E184aa ve E208a'nın DNA G+C içeriği (% mol), temel menakinon, polar lipid ve major yağ asiti analiz verileri bu tez kapsamında elde edilmiş olup, diğer türlere ait veriler suşların yanında belirtilen numaralardaki literatürlerden alınmıştır. *A. salavatliensis* DSM 22626^{T} (82), *A. gonensis* NCIMB 13933^{T} (72), *A. ayderensis* NCIMB 13972^{T} (73), *A. kamchatkensis* DSM 14988^{T} (152), *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^{T} (153), TE: Test edilmedi, ⊥: zayıf pozitif, AL: Aminolipid, DPG: Difosfatidil gliserol, GL: Glikolipid, L: Lipid, PE: Fosfatidil etanolamin, PG: Fosfatidil gliserol, PL: Fosfolipit, PN: Fosfoaminolipid]

Özellikler	**E184aa**	**E208a**	**DSM 22626^{T}**	**NCIMB 13933^{T}**	**NCIMB 13972^{T}**	**DSM 14988^{T}**	**DSM 18475^{T}**
pH aralığı	7.0-11.0	5.5-11.0	5.5-11.0	5.5-11.0	5.5-11.0	5.5-9.5	5.0-11.0
Optimum pH	7.5	7.0	8.0	6.5	6.5	8.0-8.5	7.0
Sıcaklık aralığı (°C)	37-65	37-70	37-69	40-70	30-70	38-67	35-65
Optimum sıcaklık (°C)	55	55	60	55-60	50	60	55
NaCl aralığı (%, w/v)	0-2.5	0-5	0-3.5	1.5-3	0-3	0-2.5	1.5
Optimum NaCl (%, w/v)	1-1.5	0.5-1	2.5	2	2	1	0-3
Kanamisin direnci (30 µg)	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
Katalaz	⊥	+	++	++	++	++	⊥
Amilaz	+++	++	+++	++	++	⊥	++
Oksidaz	-	⊥	+	-	+	-	-
Kazein	-	-	-	-	-	-	-
Flagella tipi	Peritriş	Monotriş	TE	TE	TE	Peritriş	TE
Hücre boyutu (en, boy) (µm)	0,22-0,66; 1,19-6,46	0,29-0,73; 1,28-7,14	0.71-2.34	0.75-5.0	0.55-4.6	1.0; 2,5-8.8	0.5;2.0-2.5
Koloni rengi	Açık sarı	Açık sarı	Sarı	Krem	Krem	Koyu sarı, mat	Krem
Spor pozisyonu	Subterminal-terminal	Subterminal-terminal	Terminal	Terminal	Subterminal-terminal	Terminal	Terminal
Şişkin spor	-	+	-	+	-	-	+
ß-galaktosidaz (ONPG) testi	-	-	-	+	+	+	+
Jelatin kullanımı	+	+	+	+	+	-	-
Nitratın nitrite indirgenmesi	-	-	-	+	-	-	-
Gliserol	-	-	+	⊥	-	+	+
L-arabinoz	-	-	-	-	+	-	-
D-riboz	-	-	-	-	⊥	-	-
D-ksiloz	-	-	-	+	+	-	-
D-galaktoz	-	-	+	+	+	+	+
D-mannoz	-	-	+	-	+	-	-
N-asetilglukozamin	-	-	-	-	⊥	-	-
Amigdalin	+	+	+	-	-	+	-
Arbutin	+	-	-	-	-	+	-
Salisin	+	-	⊥	-	+	-	-
D-sellobioz	+	+	+	-	+	+	-
D-melibioz	-	-	-	+	-	-	+
İnulin	-	-	-	-	-	+	-
D-melezitoz	-	-	-	-	-	+	-
D-raffinoz	+	+	+	+	+	-	+
Glikojen	+	+	+	+	+	⊥	+
DNA G+C içeriği (% mol)*	41.9	42.2	45.1[82]	42.8[72]	43,6[73]	42.3[152]	-
Temel menakinon*	MK-7	MK-7	MK-7[82]	-	-	-	MK-7[153]
Polar lipid*	AL, DPG, L, PE, PG, PL	AL, DPG, L, PE, PG, PL, PN	-	-	-	DPG, PE, PG, PL[152]	DPG, GL, PE, PG[153]
Major yağ asiti* (Dominant yağ asitlerinin altı çizilmiştir)	iso-$C_{15:0}$ iso-$C_{17:0}$ $C_{16:0}$	iso-$C_{15:0}$ iso-$C_{17:0}$ $C_{16:0}$	iso-$C_{15:0}$ iso-$C_{17:0}$ $C_{16:0}$[82]	iso-$C_{15:0}$ iso-$C_{17:0}$[72]	iso-$C_{15:0}$ iso-$C_{17:0}$[73]	iso-$C_{16:0}$ $C_{16:0}$ anteiso-$C_{17:0}$[153]	iso-$C_{15:0}$ iso-$C_{17:0}$ $C_{16:0}$ iso-$C_{16:0}$ anteiso-$C_{17:0}$[153]

Polar lipid içeriklerine bakıldığında, Coorevits ve ark. (2012) tarafından belirtildiği üzere, *Anoxybacillus* cinsinde dominant olarak gözlenen polar lipidler: fosfolipit (PL), fosfatidil etanolamin (PE), aminolipidler (AL) ve lipid (L)'lerdir (52). E184aa ve E208a izolatlarında ise diğer *Anoxybacillus* türlerinden farklı olarak dominant polar lipid içerikleri L, PL, AL, PE, fosfatidil gliserol (PG) ve difosfatidil gliserol (DPG) olarak bulunmuştur. Buna ilaveten E208a izolatı, E184aa'da bulunmayan ilave bir fosfoaminolipid (PN) içeriğinin yanı sıra, gerek lipid içeriğinin sayısı ve miktarı açısından gerekse diğer polar lipid içeriklerinin miktarları bakımından E184aa izolatından farklılık göstermektedir.

Anoxybacillus cinsine dahil türlerin hücresel yağ asiti içerikleri yönünden major olarak, *A. kamchatkensis* türü dışında, çoğunlukla iso-dallanmış yağ asitlerini (iso-$C_{15:0}$ ve iso-$C_{17:0}$) kapsadıkları bilinmektedir (71, 153). Özellikle, *A. rupiensis* ve *A. calidus* referans türlerinde bu iso-dallanmış yağ asitlerinin oranı % 80'den fazla olup, *Anoxybacillus* cinsinin üyeleri arasında gözlenen en yüksek seviyelere ulaşmaktadır (71, 75). E184aa ve E208a izolatlarında ise yine diğer *Anoxybacillus* türlerinde dominant olarak bulunan iso-$C_{15:0}$ ve iso-$C_{17:0}$ iso-dallanmış yağ asit içeriklerinin toplamı % 75'den fazla bulunmuştur. E184aa ve E208a izolatlarının, sırasıyla % 51.02 ile % 51.66 oranlarında iso-$C_{15:0}$ ve % 25.11 ile % 23.83 oranlarında iso-$C_{17:0}$ içeriklerine sahip oldukları belirlenmiştir. E208a izolatında, E184aa'dan farklı olarak iso-$C_{13:0}$ (% 0.18) ve $C_{18:0}$ (% 0.24) yağ asitlerinin de düşük miktarlarda bulunduğu görülmüştür. Ayrıca, her iki izolatın hücre duvarı yapısındaki peptidoglikanın tanılayıcı diamino asitinin mezo-diaminopimelik asit olduğu tespit edilmiştir.

Her ne kadar tür tanımlamasında yukarıda sonuçları verilen klasik taksonomik ve kemotaksonomik analizler önemli olsa da, eğer çalışılan bakteri 16S rRNA gen dizilimi yönünden tanımlanmış referans türlere % 97.0 ve üzerinde benzerlik gösteriyorsa, bu durumda *ad hoc* komitesi bir bakteriyel türün tanımında "***altın kural***" olarak ≥ % 97.0 benzerlik görülen en yakın akraba türlerle genomik DNA homolojisinin incelenmesini gerekli görmektedir (7). Yeni bir bakteriyel tür, ancak en yakın akraba türlerle % 70 ve altında DNA-DNA hibridizasyon oranları elde edildiği takdirde tanımlanabilmektedir (156). Bu kriterler göz önünde bulundurulduğunda, E184aa ve E208a izolatlarının % 99.4 oranında en çok birbirlerine, referans türlerden de *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T'e sırasıyla % 98.1 ve % 98.7, *A. salavatliensis* DSM 22626^T'ya % 97.9 ve % 98.2, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T'e % 97.6 ve % 98.2, *A. ayderensis* NCIMB 13972^T'e

% 97.5 ve % 98.0 ve *A. gonensis* NCIMB 13933^T'e % 97.4 ve % 97.9 oranlarında 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdikleri görülmüştür. Ayrıca, *A. thermarum* DSM 17141^T, *A. flavithermus* DSM 2641^T, *A. mongoliensis* DSM 19169^T ve *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T türlerine de % 97.0-97.4 arasında değişen daha düşük oranlarda dizi benzerlikleri saptanmıştır. Ancak, klasik fenotipik ve kemotaksonomik test sonuçları ile ITS bölgesi, tekrarlı BOX ve GTG elementlerinden elde edilen DNA parmak izi profilleri, izolatların sadece eşik değerinde benzerlik gösterdikleri referans türlerden değil, daha yüksek dizi benzerliğine sahip oldukları *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens, A. salavatliensis, A. kamchatkensis, A. ayderensis* ve *A. gonensis* türlerinden de farklı olduklarını göstermiştir. Özellikle *Rep*-PCR ve ITS-PCR DNA parmak izi teknikleri, tür ve alt tür seviyesinde dahi ayırım gücüne sahiptir (82, 179, 181, 206). Yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren bakterilerde (≥ % 97.0), PCR temelli bu tekniklerin bir arada kullanılması, oldukça zahmetli ve pahalı bir işlem olan DNA-DNA hibridizasyon analizinin hangi suşlar ile yapılması gerektiğine karar verebilmeye olanak sağlamaktadır. Yürütülen DNA parmak izi kümeleme analizlerinde, her iki izolatın da sergiledikleri eşsiz bant profilleri ile birbirlerinden ve en yakın akraba türlerden genomik DNA farklılıkları ortaya çıkarılmıştır. Bu sebeple, DNA-DNA hibridizasyon testleri sadece izolatların % 97.4 ve üzerinde 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdikleri 5 referans tür ile yapılmış ve % 97.0 ile % 97.4 arasındaki limit değerlerde benzerlik gösterdikleri diğer türlerle hibridizasyon yapılmasına gerek duyulmamıştır.

Tüm bu farklılıklara rağmen, birbirlerine yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren bakterilerde % 70 ve altındaki DNA-DNA hibridizasyon oranı, tür tanımındaki esas kriterdir. Ayrıca, bir bakteri sadece tek bir türe 70 % mol ve üzerinde DNA homolojisi göstermelidir (7). E184aa ve E208a izolatlarının en çok 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdikleri ve hibridizasyon analizi yaptırılan *A. gonensis, A. kamchatkensis, A. salavatliensis, A. ayderensis* ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* referans türlerinin tanımlanmasına ilişkin yayınlarda, tip suşun hibridize edildiği referans türler arasındaki DNA hibridizasyon oranları % 70 eşik değerinin altında bulunmuştur. Belduz ve ark. (2003) tarafından gerçekleştirilen *A. gonensis* türünün (tip suşu G2^T) tanımında, DSMZ Enstitüsü'nde yaptırılan hibridizasyon analiz sonuçlarına göre, ilgili türün *A. pushchinoensis* ve *A. flavithermus* tip suşlarına 53 % mol'den az DNA homolojisi gösterdikleri bildirilmiştir (72). Dulger ve ark. (2004) tarafından tanımlanan *A. ayderensis* (tip suşu AB04^T) türünün, yine DSMZ Enstitüsü'nde gerçekleştirilen hibridizasyon analiz

sonuçlarına göre, *A. gonensis* türüne 68.6 % mol oranında DNA homolojisi gösterdiği bulunmuştur (73). Kevbrin ve ark. (2005) tarafından *A. kamchatkensis* türü (tip suşu JW/VK-KG4T) tanımlanırken, diğerlerine kıyasla sayıca daha fazla referans türle hibridizasyon analizi yapılmıştır. Kendi yürüttükleri hibridizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre; *A. kamchatkensis* türü ile yüksek 16S dizi benzerliği gösterdiği *A. pushchinoensis* (53 % mol), *A. flavithermus* (55 % mol), *A. ayderensis* (51 % mol) ve *A. gonensis* (51 % mol) tip suşları arasında daha önceki çalışmaları destekler nitelikte düşük DNA homolojisi saptanmıştır. Yine bu çalışmada *A. ayderensis* ve *A. gonensis* arasındaki benzerlik oranı 61 % mol olarak belirlenmiştir (152). Cihan ve ark. (2011) tarafından tanımlanmış olan *A. salavatliensis* türü (tip suşu A343^T) ile en yakın akraba olduğu belirlenen *A. kamchatkensis* referansı arasındaki genomik DNA benzerliğinin 49.7 % mol olduğu bulunmuştur (82) (Çizelge 5.13). Son olarak, *A. kamchatkensis* türüne ait bir alt tür olan *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* (tip suşu KG8^T), Gul-Guven ve ark. (2008) tarafından gerçekleştirilen hibridizasyon analizlerinde; *A. gonensis*'e 48 % mol, *A. ayderensis*'e 42 % mol ve *A. kamchatkensis*'e 67.5 % mol olmak üzere sınır oranlarında benzerlik göstermiştir (153). Bu alt tür sadece bilimsel bir makalede yayınlanmış olup, IJSEM validasyon listesinde yer almadığından resmi olarak tanımlanmış değildir (149).

Tez çalışması kapsamında elde edilen DNA-DNA hibridizasyon sonuçları (Çizelge 5.12) dikkate alındığında, *Anoxybacillus* cinsine ait tüm tür tanımlarını revizyona uğratabilecek şekilde önemli bulgular elde edilmiştir. Birbirlerine 81.2 (± 5.4) % mol oranında benzer oldukları belirlenen izolatların aynı türe dahil oldukları kesinlik kazanmıştır. Ancak, E184aa ve E208a izolatları *A. ayderensis* türü (sırasıyla 19.7 ve 12.9 % mol) hariç hibridizasyon yaptırılan diğer *A. gonensis, A. kamchatkensis, A. salavatliensis* ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* türlerine 70 % mol'den fazla DNA homolojisi göstermişlerdir. Çok tekrarlı yürütülen hibridizasyon deneylerinde, E184aa ve E208a izolatları aynı zamanda en yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliği de gösterdikleri *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T alt türüne sırasıyla 82.2 (± 3.8) ve 90.3 (± 5.9) % mol oranlarında genomik DNA benzerliği göstermişlerdir. Bir bakteri sadece bir bakteriyel türe % 70'den fazla DNA-DNA hibridizasyon benzerliği gösterebildiğinden, tez kapsamında elde edilen ve öngörülemeyen bu çaprazlama sonuçları, aslında *A. gonensis, A. kamchatkensis, A. salavatliensis* ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* türlerinin tanımlanması için daha önce gerçekleştirilen DNA hibridizasyon analizlerinde deney optimizasyonundan kaynaklanabilecek sorunların olduğunu ve bu 4 türün aslında tek bir

tür altında sınıflandırılması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, 16S rRNA genleri temel alınarak oluşturulan filogenetik analizlerde, izolatlara en yakın akraba türler oldukları görülen bu 4 türün birbirlerine yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliği göstererek, filogenetik ağaçta *A. salavatliensis, A. kamchatkensis, A. gonensis ve A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* türlerinin tek bir klad içerisinde gruplandıkları belirlenmiştir.

E184aa ve E208a izolatlarını *Anoxybacillus* cinsi içerisinde en doğru taksonomik pozisyona yerleştirebilmek amacıyla, izolatların 70 % mol'den fazla benzerlik gösterdiği *A. gonensis, A. kamchatkensis, A. salavatliensis* ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* referans türlerinin tamamının kendi içlerinde çaprazlanması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, daha önce *A. salavatliensis* tür tanımında (82) hibridizasyon çalışmalarının gerçekleştirildiği DSMZ Enstitüsü'nden bu hibridizasyon deneylerinin de yapılması talep edilmiştir. DSMZ Enstitüsü'nde gerçekleştirilen son DNA-DNA hibridizasyon analiz sonuçları (Çizelge 5.12) da tüm öngörülerimizi doğrular nitelikte olmuş ve *A. kamchatkensis* türü için elde edilen hibridizasyon sonuçları genel olarak yaklaşık % 70 sınır değerlerinde olduğu için, özellikle *A. gonensis, A. salavatliensis* ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* referans türlerinin aslında tek bir tür altında toplanması gerektiğini kesin olarak ortaya koymuştur. Tüm bu bilgiler, tür tanımlarında fenotipik, kemotaksonomik ve diğer moleküler analizlerde farklılıklar saptanmış olsa da, asıl belirleyici olanın aslında doğru optimizasyon koşullarında yürütülen hibridizasyon çalışmalarının olduğunu göstermektedir.

Bununla birlikte, tez kapsamında yapılması hedeflenen tüm tür tanımı testleri gerçekleştirilmiş, ancak öngörülemeyen bu hibridizasyon sonuçlarına göre; E184aa ve E208a izolatları yeni bir *Anoxybacillus* türüne dahil edilememiş, bunun yerine *A. gonensis* NCIMB 13933^T, *A. kamchatkensis* DSM 14988^T, *A. salavatliensis* DSM 22626^T ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* DSM 18475^T referans türleri ile ilişkili bakteriler oldukları kesinlik kazanmıştır. Tez kapsamında elde edilen bu bulgular, *Anoxybacillus* cinsine ait bahsi geçen türlerin tanımlamasında ortaya çıkan bu taksonomik problemlerin çözümüne ve *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin doğru bir şekilde sınıflandırılabilmesine yönelik literatüre değerli katkılar sağlayabilecek olması bakımından önem taşımaktadır.

<u>Kısmi tür tanımı</u>: *Anoxybacillus sp.* E184aa

E184aa izolatı, Nevşehir'in Kozaklı ilçesinde bulunan Kozaklı Belediye Kaplıcası'ndaki bir toprak örneğinden izole edilmiştir. E184aa izolatı Gram (+), termofilik, fakültatif anaerobik, peritriş flagellası ile hareketli, subterminal veya terminal endosporlu, ortalama 0.44 µm eninde ve 3.83 µm boyunda olan çubuk şeklinde bir bakteridir. Kolonileri yuvarlak, kenarları ve yüzeyi düz, opak, dikey görünümü kabarık ve açık sarı renktedir. Oksidaz aktivitesi negatif, katalaz aktivitesi zayıftır. Çok yüksek amilolitik aktiviteye sahiptir (5.74 U/mL). İzolatın üreme gösterdiği sıcaklık, pH ve NaCl konsantrasyonu (%, w/v) aralıkları sırasıyla 37-65°C (optimum 55°C), 7.0-11.0 (optimum 7.5) ve % 0-2.5 (optimum % 1.0-1.5) olarak belirlenmiştir. Yapılan biyokimyasal testler sonucunda; E184aa izolatının 16S rRNA gen dizi analizlerinde en yakın akraba olduğu E208a izolatı (% 99.4) ile *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens, A. salavatliensis, A. kamchatkensis, A. ayderensis* ve *A. gonensis* (% 97.4-98.1) referans suşlarından fenotipik olarak farklı olduğu görülmüştür. Karbohidrat fermentasyon testlerindeki D-glukoz, D-fruktoz, D-mannitol, amigdalin, arbutin, eskülin, salisin, D-sellobioz, D-maltoz, D-sukroz, D-trehaloz, D-raffinoz, glikojen ve D-turanoz substratlarını kullanarak asit üretebildiği belirlenmiştir. Ancak, jelatin hidrolizi dışındaki β-galaktosidaz (ONPG) testleri, arjinin dihidrolaz, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz reaksiyonları, sitrat kullanımı, hidrojen sülfid (H_2S) üretimi, triptofan deaminaz reaksiyonu, üre kullanımı, indol üretimi, asetoin üretimi (Voges Proskauer testi), nitratın nitrite (NO_2) ve azot (N_2) gazına indirgenmesi bakımından negatif sonuçlar gözlenmiştir. Test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur. Major melakinon içeriği MK-7 (% 94) olup, eser miktarda da MK-5 (% 3) ve MK-6 (% 3) bulunmaktadır. Hücre zarında dominant olarak iso-$C_{15:0}$ (% 51.02) ve iso-$C_{17:0}$ (% 25.11) yağ asitlerinin yanı sıra daha az miktarda $C_{16:0}$ (% 8.85) yağ asitini içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca, hücre duvarında peptidoglikanın tanılayıcı diamino asit olarak mezo-diaminopimelik asit (*meso*-Dpm) içerdiği tespit edilmiştir. Polar lipid bakımından, difosfatidil gliserol, fosfatidil etanolamin, fosfatidil gliserol dışında en yakın akraba olduğu *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* ve *A. kamchatkensis* referans suşlarından farklı olarak lipidler, aminolipidler ve fosfolipit içerdiği saptanmıştır. DNA G+C içeriği 41.9 % mol'dür. E184aa izolatının ITS bölgesi ile BOX ve GTG elementlerinden elde edilen DNA profillerinin filogenetik analizleri, en çok benzerlik gösterdiği tüm referans *Anoxybacillus* türlerinden farklı olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra, en çok akrabalık gösterdiği *A. ayderensis* türü hariç, E184aa izolatının *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens, A.*

salavatliensis, A. kamchatkensis ve *A. gonensis* referans *Anoxybacillus* türleriyle % 70 sınır değerinden daha yüksek DNA-DNA hibridizasyon oranlarına sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca, bu 4 referans tür birbirlerine % 70'den fazla DNA homolojisi göstermişlerdir. Bu nedenlerle, her ne kadar yakın akraba olduğu türlerle fenotipik, kemotaksonomik ve genotipik farklılıklar saptanmış olsa da, 4 referans türe birden gösterdiği yüksek DNA hibridizasyon değerleri nedeniyle, E184aa izolatının *Anoxybacillus* cinsi içerisindeki taksonomik pozisyonu tam olarak saptanamamış, ancak bahsi geçen bu 4 referans türle ilişkili bir bakteri olduğu kesinlik kazanmıştır. E184aa kodlu izolatın kültür koleksiyon numaraları DSM 103588^T ve NCIMB 15051 olup, taksonomik olarak aşağıda sunulan şekilde sınıflandırılmıştır.

Domain = Bacteria (*Eubacteria*)

Alem = *Firmicutes* (Gram (+) Bakteri)

Sınıf = *Bacilli*

Ordo = *Bacillales*

Family = *Bacillaceae*

Genus = ***Anoxybacillus***

Species = ***Anoxybacillus sp.* E184aa**

<u>Kısmi tür tanımı</u>: *Anoxybacillus sp.* E208a

E208a izolatı, Nevşehir'in Kozaklı ilçesinde bulunan Kozaklı Belediye Kaplıcası'ndaki bir toprak örneğinden izole edilmiştir. E208a izolatı Gram (+), termofilik, fakültatif anaerobik, monotriş flagellası ile hareketli, subterminal veya terminal şişkin endosporlu, ortalama 0.51 µm eninde ve 4.21 µm boyunda olan çubuk şeklinde bir bakteridir. Kolonileri yuvarlak, kenarları ve yüzeyi düz, opak, dikey görünümü kabarık göbekli ve açık sarı renktedir. Amilaz (0.37 U/mL) ve katalaz aktivitesi pozitif, oksidaz aktivitesi ise zayıftır. İzolatın üreme gösterdiği sıcaklık, pH ve NaCl konsantrasyonu (%, w/v) aralıkları sırasıyla 37-70°C (optimum 55°C), 5.5-11.0 (optimum 7.0) ve % 0-5 (optimum % 0.5-1.0) olarak belirlenmiştir. E208a izolatı, referans türlerden *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* KCTC 13759^T dışında diğer türlerden farklı olarak daha geniş bir tuz konsantrasyonunda üreyerek halotolerant olarak gruplandırılmıştır. Yürütülen biyokimyasal testlerde, E208a izolatının 16S rRNA gen dizi analizlerinde en yakın akraba olduğu E184aa izolatı (% 99.4) ile *A.*

kamchatkensis subsp. *asaccharedens, A. salavatliensis, A. kamchatkensis, A. ayderensis* ve *A. gonensis* (% 97.9-98.7) referans suşlarından fenotipik olarak farklı olduğu görülmüştür. Ayrıca, E208a izolatının arbutin ve salisin karbohidrat fermentasyon testleri dışında tüm biyokimyasal testler bakımından E184aa izolatı ile aynı sonuçları sergilediği saptanmıştır. Diğer referanslardan ve E184aa izolatından farklı olarak 30 µg/mL kanamisine dirençli bulunmuştur. Major melakinon içeriği MK-7 (% 96) olup, eser miktarda da MK-6 (% 3) ve MK-5 (% 1) içermektedir. Hücre zarında dominant olarak iso-$C_{15:0}$ (% 51.66) ve iso-$C_{17:0}$ (% 23.83) yağ asitlerinin yanı sıra daha az miktarda $C_{16:0}$ (% 9.63) yağ asitini içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca, hücre duvarında tanılayıcı diamino asit olarak mezo-diaminopimelik asit içerdiği tespit edilmiştir. E208a izolatı, E184aa ile benzer polar lipid içeriğine sahip olup sadece ilave bir fosfoaminolipid (PN) içermekte, gerek lipid ve fosfolipid sayısı ile miktarı açısından, gerekse diğer polar lipid içeriklerinin miktarları bakımından da E184aa izolatından farklılık göstermektedir. DNA G+C içeriği 42.2 % mol'dür. E208a izolatının ITS-, BOX- ve GTG-PCR ürünlerinin filogenetik analizleri, en çok benzerlik gösterdiği tüm referans *Anoxybacillus* türlerinden farklı olduğunu gösterse de en çok akrabalık gösterdiği *A. ayderensis* türü hariç, E208a izolatı *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens, A. salavatliensis, A. kamchatkensis* ve *A. gonensis* referans *Anoxybacillus* türleriyle % 70 sınır değerinden daha yüksek DNA-DNA hibridizasyon oranlarına sahiptir. Yakın akraba olduğu türlerle fenotipik, kemotaksonomik ve genotipik farklılıklar görülmüş olmasına rağmen, 4 referans türe birden yüksek DNA homolojisi göstermesi nedeniyle, E208a izolatının *Anoxybacillus* cinsi içerisindeki kesin taksonomik pozisyonu belirlenememiş, ancak bahsi geçen bu 4 referans türle ilişkili bir bakteri olduğu netleşmiştir. E208a izolatının kültür koleksiyon numaraları DSM 103587^T ve NCIMB 15048 olup, taksonomik olarak aşağıda sunulan şekilde sınıflandırılmıştır.

Domain = Bacteria (*Eubacteria*)

Alem = *Firmicutes* (Gram (+) Bakteri)

Sınıf = *Bacilli*

Ordo = *Bacillales*

Family = *Bacillaceae*

Genus = ***Anoxybacillus***

Species = ***Anoxybacillus sp.* E208a**

6.1.2. *ANOXYBACILLUS* CİNSİ İZOLATLARIN VE REFERANSLARIN AMİLOLİTİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ, α-AMİLAZ VE SİKLODEKSTRİN GLUKANOTRANSFERAZ GENLERİNİN ÇOĞALTILMASI, DİZİLENMESİ, GENBANK AKSESYON NUMARALARININ ALINMASI, AMİNO ASİT DİZİLERİNİN FİLOGENETİK VE *IN SİLİKO* ANALİZLERİ

α-Amilazlar (EC 3.2.1.1) ve siklodekstrin glukanotransferazlar (EC 2.4.1.19), CAZy veri tabanında temel α-amilaz enzim ailesi olarak bilinen GH13 ailesine dahil olup, nişasta molekülünün ticari olarak dönüşümünde çok önemli bir yere sahiptirler. *Anoxybacillus* cinsine dahil bakterilerle yürütülen polifazik çalışmalarda, bu cins üyelerinin kuvvetli amilolitik aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir (16, 148). *Anoxybacillus* cinsinin taksonomik pozisyonunun henüz 2000 yılında tanımlanması (8) ve termostabil olmalarına bağlı olarak giderek artan biyoteknolojik önemleri sebebiyle, moleküler yapılarının ve enzimatik özelliklerinin daha iyi anlaşılması açısından *Anoxybacillus* türlerinde amilolitik enzimlerin varlığının araştırılması son zamanlarda oldukça önemli bir konu haline gelmiştir. *Anoxybacillus* cinsinin üyeleriyle yürütülen çalışmalarda, *A. flavithermus* (11, 13), *A. amylolyticus* (16), *A. flavithermus* AFA (12), *Anoxybacillus* sp. SK3-4 (ASKA) ve DT3-1 (ADTA) (18), *Anoxybacillus* sp. TSSC-1 (19), *Anoxybacillus sp*. IB-A (20), *Anoxybacillus* sp. KP1 (21), *Anoxybacillus* sp. AH1 (22, 23), *A. flavithermus* SO-13 (14), *A. flavithermus* SO-19 (15), *Anoxybacillus* sp. YIM 342 (24), *A. caldiproteolyticus* D504 ve D621 (17) izolat ve türlerinin α-amilaz ürettikleri bildirilmiştir. Bu cins üyelerinin sentezlediği termostabil siklomaltodekstrin glukanotransferazlardan bilinenleri ise sadece tüm genom dizilemesi sonucunda *Anoxybacillus* sp. B2M1 ve *Anoxybacillus* sp. B7M1 suşlarının genomlarında var olduğu bilinen siklomaltodekstrin glukanotransferazlardır. Ancak, literatürde bu iki bakterideki CGTaz enziminin aktivitesine veya karakterizasyonuna yönelik herhangi bir çalışma yer almamaktadır (33, 93).

Tez çalışmasının ikinci aşamasında, kalitatif ve kantitatif olarak amilolitik aktivite gösterdiği belirlenen, *Anoxybacillus* cinsine ait 6 izolat ile 11 referans türün, GH13 familyasına ait olan α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz enzimlerini kodlayan genleri PCR ile çoğaltılarak dizilenmiş ve GenBank aksesyon numaraları alınmıştır. Çözünebilir nişastanın (% 2) substrat olarak kullanıldığı kantitatif amilaz aktivite tayini sonuçlarına göre; E184ab (5.94 U/mL; 293.0 U/g), E184aa (5.74 U/mL; 341.3 U/g), *A. flavithermus* DSM 2641 (4.93 U/mL; 119.3 U/g), D222b (4.81 U/mL; 250.0 U/g), *A. salavatliensis* DSM 22626 (3.28 U/mL; 79.8 U/g) ve *A. amylolyticus* DSM 15939 (3.22

U/mL; 70.8 U/g) biyoteknolojik açıdan önemli olabilecek seviyede yüksek amilaz aktivitesi göstermişlerdir. Özellikle E184aa, E184ab ve D222b izolatlarının, ticari olarak termostabil amilaz üretilen *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22^T (5.52 U/mL; 182.7 U/g) gibi bazı referans türlerden daha yüksek amilolitik aktivite göstermeleri, amilaz üreticisi potansiyel yeni gen kaynaklarının saptanması açısından önemlidir. Ayrıca, *Anoxybacillus* üyeleri arasında literatürde amilaz üretici oldukları bilinen ve ticari öneme sahip olabilecek *A. flavithermus*, *A. caldiproteolyticus* ve *A. amylolyticus* türleri dışında, *A. salavatliensis* türünün de amilaz saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılma potansiyeline sahip bir bakteri olduğu ortaya konulmuştur.

Chai ve ark. (2012) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, Malezya'daki sıcak su kaynaklarından izole edilmiş *Anoxybacillus* sp. SK3-4 ve DT3-1 suşlarından iki yeni termostabil ve alkalitolerant α-amilaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca, α-amilaz enzimini kodlayan iki genin ilk kez *E. coli*'de klonlaması ile bu genlerin ve proteinlerinin dizilenmesi sonucunda, *Anoxybacillus* cinsi üyelerine ait 1.518 bç uzunluğundaki α-amilaz gen dizileri elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, yakın ilişkili *Anoxybacillus* izolatları arasındaki α-amilaz gen varyasyonlarının aydınlatılması bakımından literatürde yer alan tek kaynaktır (18).

Tez kapsamında yürütülen çalışmalarda ise, yüksek kalitatif amilolitik aktivite gösteren *Anoxybacillus* cinsine ait 6 izolatımız (A321, A3210, D222b, E184aa, E184ab ve E208a) ile 9 *Anoxybacillus* tip suşunun α-amilaz genlerinin (1515-1518 bç) ve *A. rupiensis* DSM 17127^T suşunun siklodekstrin glukanotransferaz geninin (2136 bç) tam dizileri elde edilebilmiş, ayrıca *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T suşunun siklodekstrin glukanotransferaz geni (888 bç) de kısmi olarak dizilenebilmiştir. Elde edilen bu dizilerin GenBank aksesyon numaraları alınarak GenBank veri tabanına kaydedilmiştir. Kısmi tür teşhisleri yapılan E184aa ve E208a izolatlarının α-amilaz genleri 1515 bç uzunluğundadır. Dizilenen α-amilaz genleri *amy* primeriyle, siklodekstrin glukanotransferaz genleri de *d-amy* ve *cgt* primerleri ile çoğaltılabilmiştir. *A. rupiensis* ve *A. caldiproteolyticus* türlerindeki siklodekstrin glukanotransferaz genlerinin aslında amilaz geni için tasarlanan dejenere *d-amy* primeri (18) ile çoğaltılabilmesinin sebebi, i) α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferazların Glikozid Hidrolaz enzim grubunun 13. familyasında yer almaları, ii) GH13, α-amilaz enzim ailesinin karakteristik özelliği olan, $(\beta/\alpha)_8$'li fıçı şeklinde katalitik A domaini, β3 ipliği ile A domainin α3 heliksi arasında daha uzun bir loop şeklinde B domaini ve C-terminalinde yer alan C domaini olmak üzere üç domain yapısı

içermeleri, iii) son ürünleri farklı olmakla beraber nişastayı substrat olarak kullanmaları, iv) α-amilaz enzim ailesinin üyeleri arasında karakteristik olan katalitik üçlü yapının (Asp-Glu-Asp) varlığı ve v) yine α-amilaz ailesinde bulunan, katalitik aktiviteden ve substrat bağlanmasından sorumlu birçok amino asit kökünün yer aldığı 7 korunmuş dizi bölgesini (CSR I-VII) (242) içermeleri şeklinde açıklanabilir.

NCBI-korunmuş domain arama sonuçlarına göre, dizilemesi yapılan toplam 17 genin de glikozid hidrolazların en büyük familyası olan GH13, α-amilaz enzim familyasına [*AmyAc_family Superfamily* (cl07893)] dahil oldukları, bunlardan *amy* primeri ile dizilenen 15 *Anoxybacillus* gen dizisinde, α-amilaz katalitik domaini olarak tanımlanan AmyAc-bac-CMD-like-2 (cd11339) korunmuş protein domainin yer aldığı belirlenmiştir. α-Amilaz enzimini kodlayan bu 15 genin katalitik üçlü yapı olarak korunmuş aspartat, glutamat ve aspartat amino asit kökleri (Asp213, Glu242 ve Asp310), 2 korunmuş histidin kökü (His140 ve His309) ve Ca^{+2} iyonunun bağlanmasından sorumlu 3 amino asit kökü (Asn139, Asp182 ve His217) içerdiği görülmüştür (amino asit pozisyonları E184aa α-amilaz dizisine göre numaralandırılmıştır) (Çizelge 5.15, Şekil 5.20). *d-amy* ve *cgt* primerleri ile çoğaltılarak dizilemesi yapılan *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T ve *A. rupiensis* DSM 17127^T referans türlerine ait gen dizilerinde ise maltojenik amilazlar, siklodekstrin glukanotransferaz ve ilgili proteinlerde görülen AmyAc-AmyMalt-CGTase-like (cd11320) korunmuş katalitik protein domainin yer aldığı görülmüştür. Siklodekstrin glukanotransferaz enzimini kodlayan bu iki genin katalitik üçlü yapı olarak korunmuş aspartat, glutamat ve aspartat amino asit kökleri (D256, E284 ve D355), 2 korunmuş histidin kökü (H167 ve H354), Ca^{+2} iyonunun bağlanmasından sorumlu 5 amino asit kökü (Asp55, Asn60, Asp81, Asn166 ve Asp226), MBS1 (Trp640, Lys675, Trp687, Asn692 ve Glu688) ve MBS2 (Thr622, Asn623, Gly625, Asn627, Asn651, Gln652, Tyr657 ve Trp660) olmak üzere 2 maltoz bağlanma bölgesi içerdiği belirlenmiştir (amino asit pozisyonları *A. rupiensis* DSM 17127^T CGTaz dizisine göre numaralandırılmıştır) (Çizelge 5.15, Şekil 5.21).

Şu ana kadar, http://www.bacterio.net/anoxybacillus.html (149) ve https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms.html (150) veri tabanlarında, IJSEM'de geçerli olarak tanımlanmış 22 tür ve 2 alt türle, yayınlanmış fakat henüz IJSEM'den tür tanımı onayı almamış 1 tür (*A. suryakundensis*) ve 1 alt tür (*A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens*) olmak üzere *Anoxybacillus* cinsine dahil toplam 23 bakteri türü ve 3 alt türün olduğu bilinmektedir. Ayrıca, GenBank ve Genomes OnLine

veri tabanında *Anoxybacillus* cinsi üyelerine ait toplam 27 adet gen dizisinin annotasyonu yapıldığından, bu türlerin bazılarının amilolitik gen dizileri bilinmektedir. Veri tabanlarındaki α-amilaz gen dizilerinden 10'u *Anoxybacillus* spp. izolatlarına (DT3-1, SK3-4, GXS-BL, BCO1, KU2-6, P3H1B, B2M1, B7M1, UARK-01 ve 103), 13'ü ise tanımlanmış türlere (*A. flavithermus* DSM 2641, *A. pushchinoensis* K1, *A. gonensis* G2, *A. suryakundensis* DSM 27374, *A. thermarum* AF/04, *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13, *A. ayderensis* NCIMB 13972, *A. tepidamans* PS2, *A. geothermalis* ATCC BAA 2555, *A. amylolyticus* DSM 15939, *A. kamchatkensis* G10, *A. mongoliensis* MB4 ve *A. vitaminiphilus* CGMCC 1.8979) aittir. Tez kapsamında gerçekleştirilen filogenetik analizlerde, 15 α-amilaz ve 2 siklodekstrin glukanotransferaz olmak üzere toplam 17 protein dizisi dışında, bu dizilere en çok benzerlik gösteren ilgili veri tabanlarındaki toplam 15 referans türün (13'ü *Anoxybacillus* ve 2'si *B. stearothermophilus* türlerine ait) protein dizisi ile *Anoxybacillus* türlerine ait 3 dış grup protein dizisi kullanılarak, sadece *Anoxybacillus* cinsine dahil amilolitik aktiviteye sahip protein dizileri temel alınarak, evrimsel uzaklık analizleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

Stam ve ark. (2006) tarafından belirtildiği üzere, NCBI-BLASTN tarama sonuçlarında, aynı glikozid hidrolaz subfamilyasına dahil gen dizilerindeki benzersizlik arttıkça E-değeri yavaş bir ilerleme ile artar. Ancak, diğer subfamilya üyelerine gelindikçe bu yavaş ilerleyerek artan E-değeri bu kez keskin ve ani bir artışla yükselmeye başlar (235). Dizilenen 15 α-amilaz geni, *Anoxybacillus* cinsi bakterilerden izole edilen α-amilaz genlerine en çok % 99.0-91.0 oranları arasında, yavaş ilerleyerek artan "0" E-değeri ile güvenilir sınırlarda benzerlik göstermişlerdir. Farklı bir bakteri cinsi veya glikozid hidrolaz subfamilyası üyesine gelindiğinde ise E-değerinde keskin bir artış gözlenmiştir. Ayrıca, DSM 15730^{T} ve DSM 17127^{T} siklodekstrin glukanotransferazları da en çok *Anoxybacillus* spp. B7M1 ve B2M1, *B. stearothermophilus* cgt232 ve bscgt genlerine % 84.0-99.0 oranlarında benzerlik göstermişlerdir. Dizilenen 2 siklodekstrin glukanotransferazın *Anoxybacillus* cinsi dışındaki termofilik *G. stearothermophilus* türlerine ait enzim dizilerine de benzerlik göstermeleri, *Anoxybacillus* cinsine özgü çok az sayıda termostabil siklodekstrin glukanotransferaz gen dizisinin çıkarılmış olması ve ayrıca Janecek ve ark. (1995, 1997) (331, 237) tarafından açıklandığı üzere, farklı taksonomik pozisyondaki bakterilere ait siklodekstrin glukanotransferaz gen dizilerinin genelde birbirlerine α-amilazlardan daha yüksek benzerlik göstermesi ile açıklanabilir.

Tez kapsamında elde edilen diziler ve NCBI-BLASTP programında, bu dizilere en çok benzerlik gösterdikleri belirlenen 18 referans protein dizisi kullanılarak Neighbour-joining metoduyla oluşturulan kladogram ve evrimsel uzaklık matriksleri incelendiğinde; α-amilaz protein dizileri (EC 3.2.1.1) Amy-1 ile Amy-6 arasında gruplandırılan 6 klad altında, siklodekstrin glukanotransferaz (EC 2.4.1.19) protein dizileri 2 klad (CGT-1 ve CGT-2) altında ve dış grup olarak ele alınan diziler ise yine 2 klad (dış grup-1 ve 2) altında kümelenmiştir. Özellikle izolatlarımızın (A321, A3210, D222b, E184aa, E184ab ve E208a) da bulunduğu *Amy-1* kladında, en yüksek kantitatif amilaz aktivitesi ve dizi benzerliği (% 98.5-99.9) gösteren bakterilerin bulunduğu ve yeni bir glikozid hidrolaz subfamilyasına ait olduğu öne sürülen *Anoxybacillus* sp. DT3-1 *α*-amilazının (246) da bu grupta yer alması dikkat çekicidir. Yine GH13 subfamilyasının yeni bir üyesi olduğu belirtilen *Anoxybacillus* sp. SK3-4 (246) ile düşük dizi benzerliği (% 93.1-94.1) gösteren, ancak yüksek amilolitik aktiviteye sahip *A. flavithermus* ile *A. kestanbolensis* referans türlerinden oluşan *Amy-3* kladı da ilk klad gibi biyoteknolojik olarak önemli α-amilaz üreticisi bakterileri kapsaması açısından önemlidir.

Tez kapsamında elde edilen olası 15 α-amilaz protein dizisi ve bu dizilere en çok benzerlik gösteren 12 referans dizi olmak üzere toplam 27 α-amilaz protein dizisi, E184aa izolatının amilaz dizisine göre hizalanmış ve korunmuş dizi bölgeleri, enzim aktivitesi ve substrat bağlanması için önemli amino asitler belirlenmiştir. Hizalama sonucunda, α-amilaz amino asit dizilerinde tespit edilen karakteristik özellikler Çizelge 6.2'de verilmiştir (tüm amino asit pozisyonları E184aa α-amilaz dizisine göre numaralandırılmıştır). Buna göre, tüm α-amilaz dizilerinde GH13 enzim ailesine özgü 7 CSR (CSR I-VII) bölgesi ile korunmuş katalitik üçlü yapının varlığı ortaya konulmuştur. Katalitik üçlü yapı; CSR-II'de katalitik nükleofil aspartik asit (D213), CSR-III'de proton donörü glutamik asit (E242) ve CSR-IV'de enzim geçiş-durumu stabilizatörü olan korunmuş aspartik asit (D310)'ten oluşmaktadır. CSR-II'de yine tüm α-amilaz ailesinde bulunan ve katalitik aktivite için gerekli korunmuş, değişmeyen arjinin (R211) kökü; CSR-I ve CSR-IV'de substrat bağlanmasında ve enzim geçiş durumunun stabilizasyonunda önemli oldukları bilinen ve tamamen korunmuş olmayan, sırasıyla fonksiyonel H140 ve H309 kökleri (32, 242) ve CSR-I'de aktif bölgenin bütünlüğü için gerekli olan, korunmuş D135 kökü (262) tespit edilmiştir. Bunların dışında, CSR-VI ve CSR-VII'de yapısal olarak önemli ve korunmuş olan, sırasıyla G80 ve P88 kökleri ile G341 köklerinin (242, 257) varlığı belirlenmiştir.

Çizelge 6.2. α-Amilaz amino asit dizilerinde tespit edilen karakteristik özellikler

Özellikler		***Anoxybacillus* sp. E184aa-Amy** [Δ]
Kullanılan enzim dizisinin sayısı		27
Üyeler arasındaki dizi benzerlik oranı		% 65.7-99.9
$(\alpha/\beta)_8$-fıçı domain yapısı	A domaini	+
	B domaini	+
	C domaini	+
Korunmuş dizi bölgelerinin varlığı (CSR I-VII)		+
Katalitik üçlü yapı *		D213/ E242/ D310
CSR-II'deki değişmeyen, korunmuş arjinin kökü*		R211**
CSR-V'deki karakteristik LPDLx dizi motifi		+ (LPDLA)
CSR V'deki maltoz afinitesinden ve termostabiliteden sorumlu alanin amino asiti*		A184
CSR-V ve CSR-II arasında yer alan iki ardışık triptofan amino asitleri*		W200-W201
Kalsiyum bağlanma bölgeleri*	Ca1	N139, D182, H217, E173
	Ca2	N44, N46, N49, D50, D65, G63
	Ca3	N92, E109, E110,
	Ca4	E283, E400
Maltoz bağlanmasında rol oynayan amino asit kökleri*	1) β1 iplikçiği	F36
	2) CSR-VI	W85
	3) CSR-VI'nın 3' ucu	H98, Y100, W101
	4) CSR-I	H140
	5) CSR-V'in 5' ucu	Y143, W166, F178
	6) CSR-II	R211, D213, T214, H217
	7) CSR-III	E242, W244
	8) CSR-IV	H309, D310
	9) CSR-VII	I344, Y346
	10) CSR-VII'nin 3' ucu	D358, R362
C-terminalde yer alan korunmuş tirozin ve fenilalanin amino asitleri *		Y457, Y469, F481, Y489, F492, F495, Y497
Yapısal olarak önemli amino asit kökleri*		G80 ve P88 (CSR-VI), G341(CSR-VII)

[Δ] α-Amilaz dizileri, *Anoxybacillus* sp. E184aa α-amilaz dizisine göre hizalandığından temsili dizi olarak verilmiştir.
* Tüm amino asitlerin pozisyonları, *Anoxybacillus* sp. E184aa α-amilaz dizisine göre numaralandırılmıştır.
** Sadece *Anoxybacillus* sp. P3H1B amilazında Y213

Chai ve ark. (2016) tarafından *Anoxybacillus* sp. SK3-4 α-amilazının kristal yapısının incelendiği çalışmada, amilaz yapısında 4 Ca^{+2} iyonu bağlanma bölgesi belirlenmiş ve *A. tepidamans* PS2 dışında tüm *Anoxybacillus* spp. α-amilazları arasında Ca1, Ca2 ve Ca3 bağlanma bölgeleri ile etkileşim gösterdikleri amino asit köklerinin oldukça korunmuş oldukları ortaya konulmuştur. Ca2 bölgesindeki N46 ve Ca3 bölgesindeki E109, E110 köklerinin *A. tepidamans* dışında neredeyse tüm *Anoxybacillus* α-amilazlarında korunmuş olduğu görülmüştür. Ca^{+2} iyonlarının, katalitik bölgeden uzakta yer almaları nedeniyle katalizde doğrudan rol oynamadıkları, ancak yapısal kararlığının sağlanmasında önemli oldukları öne sürülmüştür (261). Ca1 ve Ca2 bağlanma bölgeleri, GH13 ailesi üyeleri arasında korunmuştur. A ve B domainleri arasında köprü vazifesi gören Ca1 bölgesi, α-amilaz ve CGTaz'ın termostabilitesi için önemlidir (290, 302, 380, 381). A domainindeki Ca2 ve Ca3 bağlanma bölgelerinin ise katalitik domainin kararlılığının korunmasına

yardımcı oldukları düşünülmektedir (261). Tüm α-amilaz dizilerinde Ca1, Ca2, Ca3 ve Ca4 şeklinde dört kalsiyum bağlanma bölgesi (261) bulunmuştur. Ca1 bölgesi ile etkileşime giren korunmuş N139, D182, H217, E173 köklerinin, Ca2 bölgesinde ise tüm dizilerde korunmuş olan N44, D50, G63 ve D65'in yanı sıra *Anoxybacillus* sp. P3H1B amilazı (S51) dışında korunmuş N49 ve *A. tepidamans*, *A. geothermalis* ve *Anoxybacillus* sp. P3H1B amilazları (D48) dışında korunmuş olan N46 köklerinin varlığı belirlenmiştir. Ca3 bölgesinde N92, E109, E110; Ca4 bölgesinde ise E283 ve E400 kökleri bulunmuştur.

Tüm α-amilaz dizilerinde tespit edilen maltoz bağlanmasında rol oynayan amino asit kökleri (261); 1) β1 ipliğinde F36, 2) CSR-VI'da W85, 3) CSR-VI'nın downstream bölgesinde H98, Y100 ve W101, 4) CSR-I'de H140, 5) CSR-V'in upstream bölgesinde Y143, W166, F178, 6) CSR-II'de R211, D213, T214, H217, 7) CSR-III'de E242 ve W244, 8) CSR-IV'de H309 ve D310, 9) CSR-VII'de I344 ve Y346, 10) CSR-VII'nin downstream bölgesinde D358 ve R362'dir.

A. flavithermus subsp. *yunnanensis* KCTC 13759 referans dizisi dışında, tüm α-amilaz dizilerinde, CSR-V ve CSR-II bölgeleri arasında yer alan, iki ardışık triptofan kökünün (W200-W201) varlığı dikkat çekicidir. Puspasari ve ark. (2013), *Bacillus aquimaris* α-amilazının (BaqA) biyoinformatik analizleri sonucunda katalitik domainin α3 heliksinde ardışık iki triptofanın varlığını göstermişler ve bu yapının ilgili α-amilazı diğer amilaz spesifitesi gösterdiği iyi bilinen GH13 subfamilyalarından ayıran önemli bir özellik olduğunu ortaya koymuşlardır (374). Birbirini izleyen bir çift triftofan dizisi, α-amilaz spesifitesi göstermeyen, bazı oligo-1,6-glukozidaz subfamilyası (GH13_31) üyelerinde yer almaktadır (235, 382). Bunun dışında, böyle bir dizi özelliği, şu anda CAZy veri tabanında yer alan ve α-amilaz enzim spesifitesi gösteren GH13 subfamilyalarında bulunmamaktadır (246).

Tüm α-amilaz dizilerinde, CSR-V bölgesindeki LPDLx dizi motifinin (374, 375) korunmuş olduğu görülmektedir. CSR-V bölgesindeki LPDLA dizisinin sonundaki alanin kökü mutlaka korunmuş bir amino asit değildir. Örneğin; *Anoxybacillus* sp. SK3-4 suşundan izole edilmiş olan bir α-amilaz (ASKA) üzerinde gerçekleştirilen protein mühendisliği çalışmasında, CSR-V bölgesinin 5. pozisyonunda doğal olarak bulunan alaninin ASKA enziminin yüksek maltoz üretimine ve termostabilitesine katkıda bulunabileceği öngörülmüştür (375). İncelenen *Anoxybacillus* α-amilaz dizilerinde de CSR V'de A184 kökünün varlığı ortaya konulmuştur. 27 α-amilaz enzim dizisinin yaklaşık 30

amino asit uzunluğundaki C-terminal bölgesinde, 5 korunmuş fenilalanin ve tirozin aromatik amino asit köklerinin varlığı da dikkat çekmektedir. Mok ve ark. (2013) tarafından *G. thermoleovorans* α-amilazının (GTA) C-terminalinde, ham nişasta bağlanmasında ve parçalanmasında etkili olduğu öne sürülen bu korunmuş 5 aromatik amino asit kökünün varlığı tespit edilmiştir (376). Mok ve ark. (376) ile Janeček ve ark. (246) tarafından C-terminal bölgesinde varlığı bildirilen korunmuş Phe481, Tyr489, Phe492, Phe495 ve Tyr497 aromatik amino asit motiflerine ek olarak tüm dizilerde Tyr457 ve Tyr469 köklerinin de korunmuş olduğu gözlenmiştir.

Janeček ve arkadaşlarının (2015) *α*-amilazların gen dizilerini, yapılarını ve evrimsel karşılaştırmalarını biyoinformatik analizlerle yürüttükleri bir çalışmada, Chai ve ark. (2012) tarafından klonlanarak dizilenen *Anoxybacillus* sp. SK3-4 ve DT3-1 *α*-amilazlarının (18), fungal ve maya *α*-amilazların sınıflandırıldığı GH13_1 subfamilyasına daha çok benzedikleri ve 3 dizi/yapı özelliği ile farklı olduklarından, yeni bir Glikozid Hidrolaz subfamilyasını oluşturduklarını öne sürmüşlerdir (246). Buna göre, yeni bir GH13 subfamilyasına dahil oldukları öngörülen *Anoxybacillus* sp. SK3-4 ve DT3-1'den izole edilen ASKA ve ADTA enzimleri, en çok *B. aquimaris α*-amilaz BaqA (374), *G. thermoleovorans α*-amilazları olan GTA ve GTA-II (376, 383, 384) ile *Anaerobranca gottschalkii* AmyB α-amilazına (385) benzerlik göstermişlerdir. Bu enzim dizilerinin yapısal ve evrimsel kıyaslanmasını kapsayan detaylı biyoinformatik analizlere dayanılarak önerilen yeni GH13 subfamilya üyelerinde, GH13 α-amilaz familyasına özgü olan yedi korunmuş dizi bölgesinin (CSR) mevcudiyeti (242) ve katalitik üçlü yapının bulunması, yani β4 ipliğinde (CSR-II) aspartik asit, β5 ipliğinde (CSR-III) glutamik asit ve β7 ipliğinde aspartik asit varlığının yanı sıra şu kriterleri de sağlaması gerektiği öne sürülmüştür: i) C-terminal ucundaki korunmuş aromatik (tirozin ve/veya fenilalanin) amino asit köklerinin bulunması, ii) katalitik domainin alfa-3 heliksinde ardışık 2 triptofan (W) kökünün bulunması ve iii) korunmuş dizi bölgesi, CSR-V'de LPDLx dizisinin varlığı. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar, yukarıda bahsedilen Janeček ve ark. (2015) tarafından sadece 2 *Anoxybacillus* geni ile yürütülen çalışmayı (246) destekleyecek nitelikte olup, bu cins üyelerinin daha kapsamlı bir şekilde çalışılmasına imkan sağlamıştır. Ayrıca, bu çalışma ile elde edilen 15 *Anoxybacillus* α-amilazının olası protein dizilerinde yeni bir GH13 subfamilyasına dahil olma kriterlerinin (246) tamamının mevcut olduğu tespit edilmiştir.

A. rupiensis ve *A. caldiproteolyticus* siklodekstrin glukanotransferaz (CGTaz) protein dizileri ve bu dizilere en çok benzerlik gösteren 3 referans dizi ile birlikte toplam 5 CGTaz protein dizisi, *A. rupiensis* CGTaz dizisine göre hizalanmış ve hizalama sonucunda dizilerde tespit edilen karakteristik özellikler Çizelge 6.3'te verilmiştir (tüm amino asit pozisyonları *A. rupiensis* CTGaz dizisine göre numaralandırılmıştır).

Çizelge 6.3. Siklodekstrin glukanotransferaz amino asit dizilerinde tespit edilen karakteristik özellikler

Özellikler		***A. rupiensis* DSM 17127-Cgt** [Δ]
Kullanılan enzim dizisinin sayısı		5
Üyeler arasındaki dizi benzerlik oranı		% 99.3-99.9
$(\alpha/\beta)_8$-fıçı domain yapısı	A domaini	+
	B domaini	+
	C domaini	+
	D domaini	+
	E domaini	+
Korunmuş dizi bölgelerinin varlığı (CSR I-VII)		+
Katalitik üçlü yapı *		D256/ E284 / D355
CSR-II'deki değişmeyen, korunmuş arjinin kökü*		R254
Kalsiyum bağlanma bölgeleri*	Ca1	N166, I217, D226, H260
	Ca2	D55, N57, N60, N61, G79, D81
Maltoz bağlanma bölgeleri (MBS)*	MBS⊥1	W640, K675, W687, E688, N692
	MBS2	T622, N623, G625, N627, N651, Q652, Y657, W660
	MBS3	Q438, W440, I441, G473
CSR bölgelerindeki CGTaz'lara özgü korunmuş amino asitler/dizi motifleri*	1) CSR-VI	W103, Q106
	2) CSR-I	F/Y163, A/T164, P165 $A/T_{164}P_{165}$ $P_{165}N_{166}H_{167}$
	3) CSR-V	N228
	4) CSR-II	I253
	5) CSR-III	G283, W285, L287 $G_{283}E_{284}$ $W_{285}F_{286}$
	6) CSR-IV	Q/M347, I351
CSR bölgeleri dışındaki CGTaz'lara özgü korunmuş amino asitler/dizi motifleri*	1) β1 ve α1 arası	$D_{55}G_{56}$ $N_{60}N_{61}P_{62}$-G_{64} L74, D81
	2) CSR-I'in 5' ucu	A129, R130, T135
	3) CSR-I'in 3' ucu	P170, Y178, E180, G192, Y194, N196, D197, F202, H204, G207, S211, I217, Y218 219-K/R, N, L**, F/Y, D-223
	4) CSR-V ve II arası	D235, Y237, I242,W245,
	5) CSR-III'ün 3' ucu	F299, G304, M305, R317,
	6) CSR-IV ve VII arası	R380
	7) CSR-VII'nin 3' ucu	Y392, T412,
	8) C-domaini	G434, R439,
	9) E-domaini	G632, L637, G638, P658
Yapısal olarak önemli amino asit kökleri*		G56, P62, G64 (β1 ve α1 arası) G98 ve P107 (CSR-VI), G381(CSR-VII)

[Δ] CGTaz dizileri, *A. rupiensis* DSM 17127 CGTaz dizisine göre hizalandığından temsili dizi olarak verilmiştir.
* Tüm amino asitlerin pozisyonları *A. rupiensis* DSM 17127 CGTaz dizisine göre yapılmıştır.
** sadece Leu221 α-amilazlarda da bulunur.
⊥ MBS: maltoz bağlanma bölgesi (maltose binding site)

GH13 enzim ailesinin bir üyesi olan CGTaz dizilerinde de 7 korunmuş dizi bölgesinin varlığı tespit edilmiştir. CSR-II'de katalitik nükleofil D256, CSR-III'de proton donörü E284 ve CSR-IV'de enzim geçiş-durumu stabilizatörü olan D355 köklerinden oluşan katalitik Asp-Glu-Asp üçlüsü bulunmaktadır. CSR-II'de korunmuş, değişmeyen R254 (266); α-amilaz gen dizilerindekiler ile aynı fonksiyona sahip, CSR-I ve CSR-IV'de yer alan korunmuş, sırasıyla H167 ve H354 kökleri (266, 377); CSR-I'de oldukça korunmuş D162 kökü, substrat bağlanmasında ve kalsiyum ligandı olarak rol oynayan H260 kökü (289, 378) ve yine bir kalsiyum ligandı olan N166 kökü (289) tespit edilmiştir. Ayrıca, yapısal olarak önemli oldukları bilinen G56, P62, G64, G98, P107 ve G381 köklerinin (32) varlığı da belirlenmiştir. Dizilerde *B. circulans* 251 (289) ve *B. circulans* 8 CGTaz (286) yapısında yer aldığı bilinen, Ca1 ve Ca2 olmak üzere 2 ayrı kalsiyum bağlanma bölgesi tespit edilmiştir. Buna göre; Ca1 bölgesinde Ca^{+2} ile etkileşime giren, korunmuş N166, I217, D226 ve H260 kökleri ile Ca2 bölgesinde α-amilazların yapısında bulunmayan sadece CGTaz'lara özgü olan (286, 289) korunmuş D55, N57, N60, N61, G79, D81 köklerinin varlığı dikkat çekmektedir. CGTaz dizilerinde, 2 maltoz bağlanma bölgesine (MBS-1 ve 2) ilave olarak, *B. circulans* 251 CGTaz'ının (289) C domaininde bulunan MBS3 bölgesi de yer almaktadır. MBS1 bölgesinde W640, K675, W687, E688 ve N692 ve MBS2 bölgesinde T622, N623, G625, N627, N651, Q652, Y657 ve W660; MBS3 bölgesinde ise Q438, W440, I441, G473 köklerinin varlığı belirlenmiştir. CGTaz dizilerinde, CSR ve CSR dışında tespit edilen korunmuş ve CGTaz'lar için karakteristik olan amino asit kökleri de ayrıntılı bir şekilde Çizelge 6.3'te gösterilmiştir.

Ayrıca, WebLogo 3.5.0 programı yardımıyla, sadece *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin α-amilaz ve siklodekstrin glukanotransferaz çoklu hizalanmış amino asit dizileri kullanılarak, bu cinse özgü korunmuş dizi bölgelerinin tek tek ve toplu halde gösterildiği α-amilaz ve CGTaz dizi logoları oluşturulmuştur. *Anoxybacillus* cinsine ait amilaz ve CGTaz'larda yer alan korunmuş dizi bölgelerinin logoları, hizalanan dizilerinin yerine sembolik amino asitlerin varsa yer değişikliklerini ve bulunma sıklıklarını göstermesi bakımından görsel olarak kolaylık sağlamakta ve özellikle yeni GH13 α-amilaz subfamilyaların belirlenmesine yönelik çalışmalarda önemli bir veri niteliği taşımaktadır.

6.2. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada;

1. Yeni türler olduğunu öngördüğümüz E184aa ve E208a kodlu izolatlarla gerçekleştirilen tüm fenotipik, kemotaksonomik, moleküler ve filogenetik analiz sonuçlarına dayanılarak, bu izolatların birbirlerinden ve en yakın akraba türlerden farklılıkları ortaya konulmuştur. Ancak, DNA-DNA hibridizasyon verilerinin 70 % mol'den düşük olması, tür teşhisinde esas belirleyici kriter olmasına rağmen, izolatlar hibridizasyon yaptırılan 5 referans türden 4'üne yüksek DNA homolojisi göstermişlerdir.

2. Öngörülemeyen bu çaprazlama sonuçları, belirtilen tarih sırasıyla daha önce tanımlanan *A. gonensis* (72), *A. kamchatkensis* (152), *A. kamchatkensis subsp. asaccharedens* (153) ve *A. salavatliensis* (82) türlerinin aslında tek bir türe dahil olabileceklerini düşündürmüştür. Tüm *Anoxybacillus* cinsine dahil referans türlerin 16S rRNA gen dizileri temel alınarak yapılan filogenetik analizler de bu 4 türün tek bir klad altında toplandığını göstermektedir. E184aa ve E208a izolatları, yapılan hibridizasyon analizlerine rağmen tanımlanamadığından, bu izolatları *Anoxybacillus* cinsi içerisinde en doğru taksonomik pozisyona yerleştirebilmek amacıyla, izolatların 70 % mol'den fazla benzerlik gösterdiği *A. gonensis, A. kamchatkensis, A. salavatliensis* ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* referans türlerinin tamamının kendi içlerinde çaprazlanması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, DSMZ Enstitüsü'nden bu ilave hibridizasyon deneylerinin de yapılması talep edilmiştir. DSMZ Enstitüsü'nde gerçekleştirilen son DNA-DNA hibridizasyon analiz sonuçları da tüm öngörülerimizi doğrular nitelikte olmuş ve *A. kamchatkensis* türü için elde edilen hibridizasyon sonuçları sınır değerlerde olduğu için, özellikle *A. gonensis, A. salavatliensis* ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* referans türlerinin aslında tek bir tür altında sınıflandırılması gerektiğini kesin olarak ortaya koymuştur. Elde edilen tüm bu bilgiler, bir bakteri türünün tanımında esas belirleyici olan analizin, doğru şekilde optimize edilmiş koşullarda uygulanan hibridizasyon çalışmalarının olduğunu göstermiştir.

3. Tez önerisinde yapılması hedeflenen tüm tür tanımı testleri gerçekleştirilmiş, ancak yukarıda bahsedilen sebeplerle E184aa ve E208a izolatları yeni bir *Anoxybacillus* türüne dahil edilememiş, bunun yerine referans türlerin yeniden çaprazlandığı yeni analizler neticesinde, izolatların *A. gonensis, A. kamchatkensis, A. salavatliensis* ve *A. kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* referans türleri ile ilişkili bakteriler oldukları kesinlik kazanmıştır.

4. Tez çalışmasının ikinci basamağında ise, amilolitik aktivite gösteren *Anoxybacillus* cinsi 17 bakteriye ait, 15 α-amilaz ve 2 siklodekstrin glukanotransferaz geni dizilenerek gen annotasyon çalışmaları yapılmış ve tüm gen dizilerine GenBank aksesyon numaraları

alınmıştır. Ayrıca, 15 α-amilaz ve 2 CGTaz protein dizisinin filogenetik ve *in siliko* analizleri gerçekleştirilmiştir. GH13 enzim familyasına ait oldukları belirlenen tüm bu olası protein dizilerinde korunmuş dizi bölgeleri, enzim aktivitesi ve substrat bağlanması için önemli amino asitler belirlenmiş ve yeni GH13 α-amilaz subfamilyaların tanımlanmasında önemli bir veri niteliği taşıyan α-amilaz ve CGTaz dizi logoları oluşturulmuştur.

5. Literatürde *Anoxybacillus* cinsine ait türlerde yaygın olduğu bilinen amilolitik aktivite, az sayıda suşla yapılmış sınırlı sayıdaki çalışma (18) haricinde, ilk kez bu çalışma kapsamında birçok *Anoxybacillus* bakteri izolatı ve tip suşu kullanılarak gen seviyesinde araştırılmıştır.

6. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, siklodekstrin gibi önemli bir enzimatik reaksiyon ürününü üreten, 2 yeni *Anoxybacillus* cinsi üyenin siklodekstrin glukanotransferaz genlerinin *Anoxybacillus* cinsinde varlığının ve termostabilitesi nedeniyle kullanılma potansiyeli olduğunun gösterildiği ilk çalışma olması nedeniyle de önem taşımaktadır.

Öneriler:

- Tez kapsamında elde edilen çarpıcı taksonomik bulguların yayınlanması ile *Anoxybacillus* cinsine ait bahsi geçen türlerinin tanımlamasında ortaya çıkan taksonomik problemlerin çözümüne ve *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin doğru bir şekilde sınıflandırılabilmesine yönelik literatüre önemli katkılar sağlanacaktır.

- Pek çok referans türden daha yüksek amilaz aktivitesi gösteren izolatlarımızdan özellikle E184ab, E184aa ve D222b ile *A. salavatliensis* DSM 22626^{T}'nın termostabil olmaları nedeniyle, endüstriyel işlemlerde kullanılmak üzere enzim saflaştırılması ve karakterizasyonu sonucu, ticari kullanım potansiyellerinin değerlendirilmesi gibi daha ileri çalışmalarda kullanılabilecek aday suşlar oldukları görülmüştür.

- *Anoxybacillus* cinsi üyelerinin potansiyel birer amilaz gen kaynağı oldukları belirlenmiş ve elde edilen diziler GenBank veri tabanına kazandırılmıştır. Tez kapsamında elde edilen bu cinse özgü α-amilaz genleri, özellikle yeni bir GH13 subfamilya tanımlanmasının yanı sıra, enzimlerin karakterizasyonu ve üç boyutlu yapılarının ortaya çıkarılması ile ilişkili yeni araştırma projelerine konu teşkil edebilecek öneme sahiptirler.

7. KAYNAKLAR

1. Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*. 1996;60(2):407-438.
2. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. Unit 1. The foundations of microbiology. Chapter 5. Microbial growth and control. In: *Brock Biology of Microorganisms*. 14th edition. Boston: Pearson.; 2015:143-182.
3. Colwell RR. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol*. 1970;104(1):410-433.
4. Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(1):249-266.
5. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1994;44(4):846-849.
6. Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today*. 2006;33(4):152-155.
7. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Trüper HG. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1987;37(4):463-464.
8. Pikuta E, Lysenko A, Chuvilskaya N, Mendrock U, Hippe H, Suzina N, Nikitin D, Osipov G, Laurinavichius K. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000;50(6):2109-2117.
9. Pikuta E, Cleland D, Tang J. Aerobic growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1T: Emended descriptions of *A. pushchinoensis* and the genus *Anoxybacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(5):1561-1562.
10. Pikuta E, Lysenko A, Chuvilskaya N, Mendrock U, Hippe H, Suzina N, Nikitin D,

Osipov G, Laurinavichius K, Cleland D, Tang J. Genus IV. *Anoxybacillus*. In: Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,*. 2nd edn. Williams & Wilkins, New York; 2009:134-141.

11. Bolton DJ, Kelly CT, Fogarty WM. Purification and characterization of the α-amylase of *Bacillus flavothermus*. *Enzym Microb Technol*. 1997;229(96):340-343.

12. Tawil G, Viksø-Nielsen A, Rolland-Sabaté A, Colonna P, Buléon A. Hydrolysis of concentrated raw starch: A new very efficient α-amylase from *Anoxybacillus flavothermus*. *Carbohydr Polym*. 2012;87(1):46-52.

13. Agüloğlu Fincan S, Enez B, Özdemir S, Matpan Bekler F. Purification and characterization of thermostable α-amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydr Polym*. 2014;102:144-150.

14. Ozdemir S, Okumus V, Ulutas MS, Dundar A, Akarsubası AT, Dumonted S. Isolation of a novel thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* SO-13, production, characterization and industrial applications of its thermostable α-amylase. *J Bioprocess Biotech*. 2015;5(237).

15. Özdemir S, Okumus V, Ulutas MS, Dundar A, Akarsubasi AT, Dumonted S. Production and characterization of thermostable α-amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* sp. nov. SO-19. *Starch - Stärke*. 2016;68(11-12):1244-1253.

16. Poli A, Esposito E, Lama L, Orlando P, Nicolaus G, de Appolonia F, Gambacorta A, Nicolaus B. *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica). *Syst Appl Microbiol*. 2006;29(4):300-307.

17. Ozdemir SC, Cihan AC, Kilic T, Cokmus C. Optimization of thermostable alpha-amylase production from *Geobacillus* sp. D413. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*. 2016;6(1):689.

18. Chai YY, Rahman RNZRA, Illias RM, Goh KM. Cloning and characterization of two new thermostable and alkalitolerant α-amylases from the *Anoxybacillus* species that produce high levels of maltose. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2012;39(5):731-741.

19. Kikani BA, Singh SP. The stability and thermodynamic parameters of a very thermostable and calcium-independent α-amylase from a newly isolated bacterium, *Anoxybacillus beppuensis* TSSC-1. *Process Biochem*. 2012;47(12):1791-1798.

20. Hauli I, Sarkar B, Mukherjee T, Mukhopadhyay SK. Isolation and identification of a novel thermo-alkaline, thermostable, SDS and chelator resistant amylase producing *Anoxybacillus* sp. *Adv Appl Sci Res*. 2013;4(5):202-212.

21. Matpan Bekler F, Güven K. Isolation and production of thermostable α-amylase from thermophilic *Anoxybacillus* sp. KP1 from Diyadin hot spring in Ağri, Turkey. *Biologia (Bratisl)*. 2014;69(4):419-427.

22. Acer Ö, Pırınççiğlu H, Bekler FM, Gül-Güven R. *Anoxybacillus* sp. AH1, an α-amylase-producing thermophilic bacterium isolated from Dargeçit hot spring. *Biologia (Bratisl)*. 2015;70(7).

23. Acer Ö, Bekler FM, Pirinççioğlu H, Güven RG, Güven K. Purification and characterization of thermostable and detergent-stable α-amylase from *Anoxybacillus* sp. AH1. *Food Technol Biotechnol*. 2016;54(1):70-77.

24. Zhang F, Yang X, Geng L, Zhang Z, Yin Y, Li W. Purification and characterization of a novel and versatile α-amylase from thermophilic *Anoxybacillus* sp. YIM 342. *Starch/Staerke*. 2016;68(5-6):446-453.

25. Pandey A, Nigam P, Soccol C, Soccol V, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2000;31(2):135-152.

26. De Souza PM, de Oliveira Magalhães P. Application of microbial α-amylase in industry-a review. *Braz J Microbiol*. 2010;41:850-861.

27. Tiwari SP, Srivastava R, Singh CS, Shukla K, Singh RK, Singh P, Singh R, Singh NL, Sharma, R. Amylases: An overview with special reference to alpha amylase. *J Glob Biosci*. 2015;4(1):1886-1901.

28. Nielsen JE, Borchert TV. Protein engineering of bacterial α-amylases. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1543:253-274.

29. El-fallal A, Dobara MA, El-sayed A, Omar N. Starch and microbial α-amylases : from concepts to biotechnological applications. *Carbohydrates-comprensive Stud Glycobiol Glycotechnol*. 2012:459-489.

30. Mobini-Dehkordi M, Javan FA. Application of alpha-amylase in biotechnology. *J*

Biol today's world. 2012;1(1):15-20.

31. Vassileva A, Beschkov V, Ivanova V, Tonkova A. Continuous cyclodextrin glucanotransferase production by free and immobilized cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783 in bioreactors. *Process Biochem*. 2005;40(10):3290-3295.

32. van der Veen BA, Uitdehaag JC, Dijkstra BW, Dijkhuizen L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Protein Struct Mol Enzymol*. 2000;1543(2):336-360.

33. Abelian VA, Balayan AM, Manukyan LS, Afyan KB, Meliksetyan VS, Andreasyan NA, Markosyan AA. Characteristics of cyclodextrin production using cyclodextrin glucanotransferases from various groups of microorganisms. *Appl Biochem Microbiol*. 2002;38(6):527-535.

34. Brock TD. The genus *Thermus*. In: *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*. Springer New York.; 1978:72-91.

35. Mehta D, Satyanarayana T. Diversity of hot environments and thermophilic microbes. In: Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y, eds. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013:3-60.

36. Bertoldo C, Antranikian G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr Opin Chem Biol*. 2002;6(2):151-160.

37. Zeldes BM, Keller MW, Loder AJ, Straub CT, Adams MWW, Kelly RM. Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. *Front Microbiol*. 2015;6:1209.

38. Kambourova M, Radchenkova N, Tomova I, Bojadjieva I. Thermophiles as a promising source of exopolysaccharides with interesting properties. In: Rampelotto PH, ed. *Grand Challenges in Biology and Biotechnology Biotechnology of Extremophiles*. Springer International Publishing; 2016:731.

39. Adiguzel A, Ozkan H, Baris O, Inan K, Gulluce M, Sahin F. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J Microbiol Meth*. 2009;79(3):321-328.

40. Cohn F. Genus *Micrococcus*. *Beitr Biol Pflanz*. 1872;1:127-224.

41. Fritze D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic

endospore-forming bacteria. *Phytopathology*. 2004;94(11):1245-1248.

42. Golovacheva RS, Karavaiko GI. *Sulfobacillu*s, a new genus of thermophilic sporulating bacteria. *Mikrobiologiia*. 1978;47(5):815-822.

43. Wisotzkey JD, Jurtshuk P, Fox GE, Deinhard G, Poralla K. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestri*s, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1992;42(2):263-269.

44. Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Komagata K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1996;46(4):939-946.

45. Touzel JP, O'Donohue M, Debeire P, Samain E, Breton C. *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000;50(1):315-320.

46. Nazina TN, Tourova TP, Poltaraus AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Lysenko AM, Petrunyaka VV, Osipov GA, Belyaev SS, Ivanov MV. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(2):433-446.

47. Grazia Fortina M, Pukall R, Schumann P, Mora D, Parini C, Luigi Manachini P, Stackebrandt E. *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson et al. 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(2):447-455.

48. Nakamura K, Haruta S, Ueno S, Ishii M, Yokota A, Igarashi Y. *Cerasibacillus quisquiliarum* gen. nov., sp. nov., isolated from a semi-continuous decomposing system of kitchen refuse. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(4):1063-1069.

49. Xue Y, Zhang X, Zhou C, Zhao Y, Cowan DA, Heaphy S, Grant WD, Jones BE, Ventosa A, Ma Y. *Caldalkalibacillus thermarum* gen. nov., sp. nov., a novel

alkalithermophilic bacterium from a hot spring in China. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(6):1217-1221.

50. Zhao W, Weber C, Zhang CL, Romanek CS, King GM, Mills G, Sokolova T, Wiegel J. *Thermalkalibacillus uzonensis* gen. nov. sp. nov, a novel aerobic alkali-tolerant thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Uzon Caldera, Kamchatka. *Extremophiles*. 2006;10(4):337-345.

51. Miñana-Galbis D, Pinzón DL, Lorén JG, Manresa À, Oliart-Ros RM. Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz et al. 1988) Banat et al. 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(7):1600-1604.

52. Coorevits A, Dinsdale AE, Halket G, Lebbe L, De Vos P, Van Landschoot A, Logan NA. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly "*thermoglucosidasius*"); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus*; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012;62(7):1470-1485.

53. Cihan AC, Koc M, Ozcan B, Tekin N, Cokmus C. *Thermolongibacillus altinsuensis* gen. nov., sp. nov. and *Thermolongibacillus kozakliensis* sp. nov., aerobic, thermophilic, long bacilli isolated from hot springs. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64:187-197.

54. Logan NA, Berge O, Bishop AH, Busse HJ, De Vos P, Fritze D, Heyndrickx M, Kämpfer P, Rabinovitch L, Salkinoja-Salonen MS, Seldin, L, Ventosa A. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009;59(8):2114-2121.

55. Pirie JH. The genus *Listerella*. *Pirie Sci*. 1940;91:383.

56. Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1993;64(3-4):253-260.

57. Metchnikoff ME. *Pasteuria ramosa* un representant des bacteries a division longitudinale. *Ann Inst Pasteur*. 1888;2:165-170.

58. Kluyver AJ, van Niel CB. Prospects for a natural classification of bacteria. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infekt Hyg Abt II*. 1936;94:369-403.

59. Kitahara K, Suzuki J. *Sporolactobacillus* nov. subgen. *J Gen Appl Microbiol*. 1963;9:59-71.

60. Rosenbach AJF. Mikro-organismen bei den. In: Bergmann JF, ed. Wund-Infections-Krankheiten Des Menschen., editor; Germany: Wiesbaden; 1884:1-122.

61. Tsilinsky P. On the thermophilic moulds. *Ann Inst Pasteur*. 1899;13:500-505.

62. Ludwig W, Schleifer KH, Whitman, WB. Revised road map to the phylum *Firmicutes*. In: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. New York: Springer; 2009:1-13.

63. Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol*. 1991;13(4):202-206.

64. Rainey FA, Fritze D, Stackebrandt E. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;115(2-3):205-211.

65. Burgess SA, Brooks JD, Rakonjac J, Walker KM, Flint SH. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *J Appl Microbiol*. 2009;107(3):1012-1018.

66. Cihan AC, Tekin N, Ozcan B, Cokmus C. The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16s rRNA gene sequences and ARDRA analyses isolated from geothermal regions of Turkey. *Brazilian J Microbiol*. 2012;43(1):309-324.

67. Goh KM, Kahar UM, Chai YY, Chong CS, Chai KP, Ranjani V, Illias RM, Chan KG. Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(4):1475-1488.

68. Demirjian DC, Morís-Varas F, Cassidy CS. Enzymes from extremophiles. *Curr Opin Chem Biol*. 2001;5(2):144-151.

69. Mee HS. *Sequence analysis of starch degrading enzymes from Anoxybacillus species* [master's thesis]. Malaysia: Universiti Teknologi Malaysia; 2012.

70. Deep K, Poddar A, Das SK. *Anoxybacillus suryakundensis* sp. nov, a moderately

thermophilic, alkalitolerant bacterium isolated from hot spring at Jharkhand, India. *PLoS One*. 2013;8(12).

71. Cihan AC, Cokmus C, Koc M, Ozcan B. *Anoxybacillus calidus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from soil near a thermal power plant. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64:211-219.

72. Belduz AO, Dulger S, Demirbag Z. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(5):1315-1320.

73. Dulger S, Demirbag Z, Belduz AO. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(5):1499-1503.

74. Yumoto I, Hirota K, Kawahara T, Nodasaka Y, Okuyama H, Matsuyama H, Yokota Y, Nakajima K, Hoshino T. *Anoxybacillus voinovskiensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a hot spring in Kamchatka. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(4):1239-1242.

75. Derekova A, Sjøholm C, Mandeva R, Kambourova M. *Anoxybacillus rupiensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria). *Extremophiles*. 2007;11(4):577-583.

76. Atanassova M, Derekova A, Mandeva R, Sjøholm C, Kambourova M. *Anoxybacillus bogrovensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Dolni Bogrov, Bulgaria. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58(10):2359-2362.

77. Poli A, Romano I, Cordella P, Orlando P, Nicolaus B, Berrini CC. *Anoxybacillus thermarum* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from thermal mud in Euganean hot springs, Abano Terme, Italy. *Extremophiles*. 2009;13(6):867-874.

78. Dai J, Liu Y, Lei Y, Gao Y, Han F, Xiao Y, Peng H. A new subspecies of *Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanensis* ssp. nov. with very high ethanol tolerance. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;320(1):72-78.

79. Zhang CM, Huang XW, Pan WZ, Zhang J, Wei KB, Klenk HP, Tang SK, Li WJ, Zhang KQ. *Anoxybacillus tengchongensis* sp. nov. and *Anoxybacillus eryuanensis* sp. nov., facultatively anaerobic, alkalitolerant bacteria from hot springs. *Int J Syst*

Evol Microbiol. 2011;61(1):118-122.

80. Zhang XQ, Zhang ZL, Wu N, Zhu XF, Wu M. *Anoxybacillus vitaminiphilus* sp. nov., a strictly aerobic and moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63:4064-4071.

81. Inan K, Belduz AO, Canakci S. *Anoxybacillus kaynarcensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylanase producing bacterium. *J Basic Microbiol*. 2013;53(5):410-419.

82. Cihan AC, Ozcan B, Cokmus C. *Anoxybacillus salavatliensis* sp. nov., an α-glucosidase producing, thermophilic bacterium isolated from Salavatli, Turkey. *J Basic Microbiol*. 2011;51(2):136-146.

83. Reginensi SM, González MJ, Olivera JA, Sosa M, Juliano P, Bermúdez J. RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *Int J Food Microbiol*. 2011;148(1):36-41.

84. Ronimus RS, Parker LE, Turner N, Poudel S, Rückert A, Morgan HW. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *Int J Food Microbiol*. 2003;85(1-2):45-61.

85. Rückert A, Ronimus RS, Morgan HW. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *Int J Food Microbiol*. 2004;96(3):263-272.

86. Yuan DD, Liu GC, Ren D, Zhang D, Zhao L, Kan CP, Yang YZ, Ma W, Li Y, Zhang LB. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Control*. 2012;25(2):752-757.

87. Palmer JS, Flint SH, Schmid J, Brooks JD. The role of surface charge and hydrophobicity in the attachment of *Anoxybacillus flavithermus* isolated from milk powder. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010;37(11):1111-1119.

88. Paul SC, Jain P, Mitra J, Dutta S, Bhattacharya P, Bal B, Bhattacharyya D, Gupta SD, Pal S. Induction of Cr(VI) reduction activity in an *Anoxybacillus* strain under heat stress: a biochemical and proteomic study. *FEMS Microbiol Lett*. 2012;331(1):70-80.

89. Somerton B, Palmer J, Brooks J, Smolinski E, Lindsay D, Flint S. Influence of cations on growth of thermophilic *Geobacillus* spp. and *Anoxybacillus flavithermus*

in planktonic culture. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(7):2477-2481.

90. Saw JH, Mountain BW, Feng L, Omelchenko MV, Hou S, Saito JA, Stott MB, Li D, Zhao G, Wu J, Galperin MY, Koonin EV, Makarova KS, Wolf YI, Rigden DJ, Dunfield PF, Wang L, Alam M. Encapsulated in silica: genome, proteome and physiology of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1. *Genome Biol*. 2008;9(11):R161.

91. Lim YL, Chan KG, Ee R, Belduz, AO, Canakci S, Kahar UM, Yaakop AS, Goh KM. Complete genome of the potential thermozyme producer *Anoxybacillus gonensis* G2T isolated from the Gönen hot springs in Turkey. *J Biotechnol*. 2015;212:65-66.

92. Filippidou S, Jaussi M, Junier T, Wunderlin T, Jeanneret N, Palmieri F, Palmieri I, Roussel-Delif L, Vieth-Hillebrand A, Vetter A, Chain P, Regenspurg S, Junier P. *Anoxybacillus geothermalis* sp. nov., a facultatively anaerobic, endospore-forming bacterium isolated from mineral deposits in a geothermal station. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(8):2944-2951.

93. Caspers MPM, Boekhorst J, Abee T, Siezen RJ. Complete genome sequence of *Anoxybacillus flavithermus* TNO-09.006, a thermophilic sporeformer associated with a dairy-processing environment. *Genome*. 2013;1(1):9-10.

94. Lee SJ, Lee YJ, Ryu N, Park S, Jeong H, Lee SJ, Kim BC, Lee DW, Lee HS. Draft genome sequence of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus kamchatkensis* G10. *J Bacteriol*. 2012;194(23):6684-6685.

95. Goh KM, Gan HM, Chan KG, Chan GF, Shahar S, Chong CS, Kahar UM, Chai KP. Analysis of *Anoxybacillus* genomes from the aspects of lifestyle adaptations, prophage diversity, and carbohydrate metabolism. *PLoS One*. 2014;9(3).

96. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D32-D37.

97. Mukherjee S, Stamatis D, Bertsch J, Ovchinnikova G, Verezemska O, Isbandi M, Thomas AD, Ali R, Sharma K, Kyrpides NC, Reddy TBK. Genomes OnLine Database (GOLD) v.6: data updates and feature enhancements. *Nucleic Acids Res*. 2017;45 (D1):D446-D456.

98. Matsutani M, Shirakihara Y, Imada K, Yakushi T. Draft genome sequence of a

thermophilic member of the *Bacillaceae*, *Anoxybacillus flavithermus* strain Kn10, isolated from the Kan-nawa Hot Spring in Japan. *Genome Announc*. 2013;1(3):10-11.

99. Wang Y, Zheng Y, Wang M, Gao Y, Xiao Y, Peng H. Non-contiguous finished genome sequence of *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* type strain (E13T), a strictly thermophilic and organic solvent-tolerant bacterium. *Stand Genomic Sci*. 2014;9(3):735-743.

100. Rozanov AS, Bryanskaya AV, Kotenko AV, Malup TK, Peltek SE. Draft genome sequence of *Anoxybacillus flavithermus* strain 25, isolated from the Garga Hot Spring in the Barguzin Valley, Baikal Region, Russian Federation. *Genome Announc*. 2014;2(6):e01258-14.

101. Khalil A, Sivakumar N, Qarawi S. Genome sequence of *Anoxybacillus flavithermus* strain AK1, a thermophile isolated from a hot spring in Saudi Arabia. *Genome Announc*. 2015;3(3): e00604-15.

102. Belduz AO, Canakci S, Chan K-G, Kahar UM, Chan CS, Yaakop AS, Goh KM. Genome sequence of *Anoxybacillus ayderensis* AB04T isolated from the Ayder hot spring in Turkey. *Stand Genomic Sci*. 2015;10(1):70.

103. Patel BKC. Draft genome sequence of *Anoxybacillus* strain BCO1, isolated from a thermophilic microbial mat colonizing the outflow of a bore well of the Great Artesian Basin of Australia. *Genome Announc*. 2015;3(1):10-11.

104. Ogg CD, Spanevello MD, Patel BKC. Exploring the ecology of thermophiles from Australia's Great Artesian Basin during the genomic era. In: Satyanarayana T, Littlechild J , Kawarabayasi Y, eds. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. New York: Springer; 2013:61-97.

105. Poli A, Nicolaus B, Chan K-G, Kahar UM, Chan CS, Goh KM. Genome sequence of *Anoxybacillus thermarum* AF/04T, isolated from the Euganean Hot Springs in Abano Terme, Italy. *Genome Announc*. 2015;3(3):e00490-15.

106. Filippidou S, Jaussi M, Junier T, Wunderlin T, Roussel-Delif L, Jeanneret N, Vieth-Hillebrand A, Vetter A, Regenspurg S, Johnson SL, McMurry K, Gleasner CD, Lo CC, Li P, Vuyisich M, Chain PS, Junier P. Genome sequence of *Anoxybacillus geothermalis* strain GSsed3, a novel thermophilic endospore-forming species. *Genome Announc*. 2015;3(3):10-11.

107. Berendsen EM, Wells-Bennik MH, Krawczyk AO, de Jong A, van Heel A, Holsappel S, Eijlander RT, Kuipers OP. Draft genome sequences of seven thermophilic spore-forming bacteria isolated from foods that produce highly heat-resistant spores, comprising *Geobacillus* spp., *Caldibacillus debilis*, and *Anoxybacillus flavithermus*. *Genome Announc*. 2016;4(3):e00105-16.

108. Trivedi S, Rao SR, Gehlot HS. Nucleic acid stability in thermophilic prokaryotes : a review. *J Cell Mol Biol*. 2005;4:61-69.

109. Perugino G, Valenti A, D'Amaro A, Rossi M, Ciaramella M. Reverse gyrase and genome stability in hyperthermophilic organisms. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(1):69-73.

110. Heine M, Chandra SBC. The linkage between reverse gyrase and hyperthermophiles: a review of their invariable association. *J Microbiol*. 2009;47(3):229-234.

111. Hou M-H, Lin S-B, Yuann J-MP, Lin W-C, Wang AH-J, Kan L-S. Effects of polyamines on the thermal stability and formation kinetics of DNA duplexes with abnormal structure. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(24):5121-5128.

112. Hosoya R, Hamana K, Niitsu M, Itoh T. Polyamine analysis for chemotaxonomy of thermophilic eubacteria: polyamine distribution profiles within the orders *Aquificales*, *Thermotogales*, *Thermodesulfobacteriales*, *Thermales*, *Thermoanaerobacteriales*, *Clostridiales* and *Bacillales*. *J Gen Appl Microbiol*. 2004;50(5):271-287.

113. Mukherjee A, Sokunbi AO, Grove A. DNA protection by histone-like protein HU from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(12):3956-3968.

114. Kumar S, Tsai C-J, Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng*. 2000;13(3):179-191.

115. Phadtare S. Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol*. 2004;6(2):125-136.

116. Namsaraev ZB, Babasanova OB, Dunaevsky YE, Akimov VN, Barkhutova DD, Gorlenko VM, Namsaraev BB. *Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring,

central Mongolia. *Mikrobiologiia*. 2010;79(4):516-523.

117. Çolak A, Şişik D, Saglam N, Güner S, Çanakçi S, Beldüz AO. Characterization of a thermoalkalophilic esterase from a novel thermophilic bacterium, *Anoxybacillus gonensis* G2. *Bioresour Technol*. 2005;96(5):625-631.

118. Faiz O, Colak A, Saglam N, Canakçi S, Beldüz AO. Determination and characterization of thermostable esterolytic activity from a novel thermophilic bacterium *Anoxybacillus gonensis* A4. *J Biochem Mol Biol*. 2007;40(4):588-594.

119. Ertunga NS, Colak A, Belduz AO, Canakci S, Karaoglu H, Sandalli C. Cloning, expression, purification and characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Anoxybacillus gonensis* G2. *J Biochem*. 2007;141(6):817-825.

120. Olusesan AT, Azura LK, Abubakar F, Hamid NSA, Radu S, Saari N. Phenotypic and molecular identification of a novel thermophilic *Anoxybacillus* species: a lipase-producing bacterium isolated from a Malaysian hotspring. *World J Microbiol Biotechnol*. 2009;25(11):1981-1988.

121. Kambourova M, Mandeva R, Fiume I, Maurelli L, Rossi M, Morana A. Hydrolysis of xylan at high temperature by co-action of the xylanase from *Anoxybacillus flavithermus* BC and the β-xylosidase/α-arabinosidase from *Sulfolobus solfataricus* Oα. *J Appl Microbiol*. 2007;102(6):1586-1593.

122. Ibrahim ASS, El-diwany AI. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Aust J Basic Appl Sci*. 2007;1(4):473-478.

123. Kacagan M, Canakci S, Sandalli C, Inan K, Colak DN, Belduz AO. Characterization of a xylanase from a thermophilic strain of *Anoxybacillus pushchinoensis* A8. *Biologia (Bratisl)*. 2008;63(5):599-606.

124. Chai YY, Kahar UM, Salleh MM, Illias RM, Goh KM. Isolation and characterization of pullulan-degrading *Anoxybacillus* species isolated from Malaysian hot springs. *Environ Technol*. 2012;33(11):1231-1238.

125. Shaojing S, Fuping L, Nan J, Li L, Jianyong X, Muchen C, Hui S. Study of a novel thermostable pullulanase producing strain *Anoxybacillus* sp. LM14-2. *Biotechnol Bull*. 2011;9:136-141.

126. Kahar UM, Chan KG, Salleh MM, Mee Hii S, Goh KM. A high molecular-mass

Anoxybacillus sp. SK3-4 amylopullulanase: characterization and its relationship in carbohydrate utilization. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):11302-11318.

127. Turner P, Holst O, Karlsson EN. Optimized expression of soluble cyclomaltodextrinase of thermophilic origin in *Escherichia coli* by using a soluble fusion-tag and by tuning of inducer concentration. *Protein Expr Purif*. 2005;39(1):54-60.

128. Turner P, Labes A, Fridjonsson OH, Hreggvidson GO, Schönheit P, Kristjansson JK, Holst O, Karlsson EN. Two novel cyclodextrin-degrading enzymes isolated from thermophilic bacteria have similar domain structures but differ in oligomeric state and activity profile. *J Biosci Bioeng*. 2005;100(4):380-390.

129. Wang J, Bai Y, Yang P, Shi P, Luo H, Meng K, Huang H, Yin J, Yao B. A new xylanase from thermoalkaline *Anoxybacillus* sp. E2 with high activity and stability over a broad pH range. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010;26(5):917-924.

130. Canakci S, Kacagan M, Inan K, Belduz AO, Saha BC. Cloning, purification, and characterization of a thermostable alpha-L-arabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;81(1):61-68.

131. Beris FS, De Smet L, Karaoglu H, Canakci S, Van Beeumen J, Belduz AO. The ATPase activity of the G2alt gene encoding an aluminium tolerance protein from *Anoxybacillus gonensis* G2. *J Microbiol*. 2011;49(4):641-650.

132. Ay F, Karaoglu H, Inan K, Canakci S, Belduz AO. Cloning, purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from *Anoxybacillus* sp. PDF1. *Protein Expr Purif*. 2011;80(1):74-79.

133. Chiş L, Hriscu M, Bica A, Toşa M, Nagy G, Róna G, Vértessy BG, Irimie FD. Molecular cloning and characterization of a thermostable esterase/lipase produced by a novel *Anoxybacillus flavithermus* strain. *J Gen Appl Microbiol*. 2013;59(2):119-134.

134. D'souza DR, Morgan RD, Parashar V, Capalash N, Sharma P. Characterization of BflI-a thermostable, Co^{++}-requiring isoschizomer of BsiYI from *Anoxybacillus flavithermus*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2004;20:593–598.

135. Li Y, Zhu Y, Liu A, Sun Y. Identification and characterization of a novel L-arabinose isomerase from *Anoxybacillus flavithermus* useful in D-tagatose

production. *Extremophiles*. 2011;15(3):441-450.

136. Deive FJ, Domínguez A, Barrio T, Moscoso F, Morán P, Longo MA, Sanromán MA. Decolorization of dye Reactive Black 5 by newly isolated thermophilic microorganisms from geothermal sites in Galicia (Spain). *J Hazard Mater*. 2010;182(1-3):735-742.

137. Gursahani YH, Gupta SG. Decolourization of textile effluent by a thermophilic bacteria *Anoxybacillus rupiensis*. *Pet Environ Biotechnol*. 2011;2(2):2-4.

138. Chatziefthimiou AD, Crespo-Medina M, Wang Y, Vetriani C, Barkay T. The isolation and initial characterization of mercury resistant chemolithotrophic thermophilic bacteria from mercury rich geothermal springs. *Extremophiles*. 2007;11(3):469-479.

139. Ghaffari S, Sepahi AA, Razavi MR, Malekzadeh F, Haydarian H. Effectiveness of inoculation with isolated *Anoxybacillus* sp. MGA110 on municipal solid waste composting process. *African J Microbiol Res*. 2011;5(30):5373-5378.

140. Shafiei M, Ziaee AA, Amoozegar MA. Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic α-amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38(2):275-281.

141. Arikan B. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresour Technol*. 2008;99(8):3071-3076.

142. Hmidet N, Bayoudh A, Berrin JG, Kanoun S, Juge N, Nasri M. Purification and biochemical characterization of a novel α-amylase from *Bacillus licheniformis* NH1: Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. *Process Biochem*. 2008;43(5):499-510.

143. Hagihara H, Igarashi K, Hayashi Y, Endo K, Ikawa-Kitayama K, Ozaki, K, Kawai S, Ito S. Novel α-amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(4):1744-1750.

144. Murakami S, Nagasaki K, Nishimoto H, Shigematu R, Umesaki J, Takenaka S, Kaulpiboon J, Prousoontorn M, Limpaseni T, Pongsawasdi P, Aoki K. Purification and characterization of five alkaline, thermotolerant, and maltotetraose-producing a-

amylases from *Bacillus halodurans* MS-2-5, and production of recombinant enzymes in *Escherichia coli*. *Enzym Microb Technol,*. 2008;43:321-328.

145. Viksø-Nielsen A, Andersen C, Hoff T, Pedersen S. Development of new alpha-amylases for raw starch hydrolysis. *Biocatal Biotransformation*. 2006;24(1-2):121-127.

146. Özdemir S, Matpan F, Okumus V, Dündar A, Ulutas MS, Kumru M. Isolation of a thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* sp. nov. and production of thermostable α-amylase under solid-state fermentation (SSF). *Ann Microbiol*. 2012;62(4):1367-1375.

147. Cihan AC. Taxonomic classification of *Anoxybacillus* isolates from geothermal regions in Turkey by 16S rRNA gene sequences and ARDRA, ITS-PCR, Rep-PCR analyses. *Polish J Microbiol*. 2013;62(2):149-163.

148. Genus *Anoxybacillus*. Published June 18, 2015. Available at: http://www.bacterio.net/anoxybacillus.html. Accessed March 6, 2017.

149. Catalogue of microorganisms. Published September 18, 2017. Available at: https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms.html. Accessed March 6, 2017.

150. Heinen W, Lauwers AM, Mulders JWM. *Bacillus flavothermus*, a newly isolated facultative thermophile. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Microbiol*. 1982;48:265-272.

151. De Clerck E, Rodríguez-Díaz M, Vanhoutte T, Heyrman J, Logan NA, De Vos P. *Anoxybacillus contaminans* sp. nov. and *Bacillus gelatini* sp. nov., isolated from contaminated gelatin batches. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(3):941-946.

152. Kevbrin VV, Zengler K, Lysenko AM, Wiegel J. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka. *Extremophiles*. 2005;9(5):391-398.

153. Gul-Guven R, Guven K, Poli A, Nicolaus B. *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* subsp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Batman. *J Gen Appl Microbiol*. 2008;54(6):327-334.

154. Chen XG, Stabnikova O, Tay JH, Wang JY, Tay STL. Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge.

Extremophiles. 2004;8(6):489-498.

155. Schäffer C, Franck WL, Scheberl A, Kosma P, McDermott TR, Messner P. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(6):2361-2368.

156. Stackebrandt E, Fredericksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. Report of the *ad hoc* comittee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002;52:1043-1047.

157. Kämpfer P, Glaeser SP. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era- the polyphasic approach revisited. *Environ Microbiol*. 2012;14(2):291-317.

158. Oren A, Garrity GM. Then and now: A systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014;106(1):43-56.

159. Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64:346-351.

160. Ramasamy D, Mishra AK, Lagier JC, Padhmanabhan R, Rossi M, Sentausa E, Raoult D, Fournier PE. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64:384-391.

161. Rosselló-Móra R. Towards a taxonomy of Bacteria and Archaea based on interactive and cumulative data repositories. *Environ Microbiol*. 2012;14(2):318-334.

162. Sarethy IP, Pan S, Danquah MK. Modern Taxonomy for Microbial Diversity. In: Grillo O, ed. *Biodiversity - The Dynamic Balance of the Planet*. InTech; 2014:51-68.

163. Schumann P. Peptidoglycan Structure. In: Rainey F, Oren A, eds. *Methods in Microbiology Volume 38 Taxonomy of Prokaryotes*. First edit. Elsevier Ltd; 2011:101-129.

164. Nowicka B, Kruk J. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2010;1797(9):1587-1605.

165. Collins MD, Jones D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria

and their taxonomic implication. *Microbiol Rev*. 1981;45(2):316-354.

166. Prakash O, Verma M, Sharma P, Kumar M, Kumari K, Singh A, Kumari H, Jit S, Gupta SK, Khanna M, Lal R. Polyphasic approach of bacterial classification - an overview of recent advances. *Indian J Microbiol*. 2007;47(2):98-108.

167. Chun J, Rainey FA. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64:316-324.

168. Martinez-Murcia AJ, Collins MD. A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol Lett*. 1990;70(1):73-83.

169. Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to quarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol*. 1992;42(1):166-170.

170. Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol*. 1992;42(3):412-421.

171. Stackebrandt E. The richness of prokaryotic diversity: There must be a species somewhere. *Food Technol Biotechnol*. 2003;41(1):17-22.

172. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*. 2013;14(1):60.

173. Rodas AM, Ferrer S, Pardo I. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst Appl Microbiol*. 2003;26(3):412-422.

174. Gürtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. 1996;142(1):3-16.

175. Sadeghifard N, Gürtler V, Beer M, Seviour RJ. The mosaic nature of intergenic 16S-23S rRNA spacer regions suggests rRNA operon copy number variation in *Clostridium difficile* strains. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(11):7311-7323.

176. García-Martínez J, Acinas SG, Anton AI, Rodríguez-Valera F. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J Microbiol*

Methods. 1999;36(1):55-64.

177. Li W, Raoult D, Fournier PE. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33(5):892-916.

178. Rademaker JLW, Aarts HJ, Vinuesa P. Molecular typing of environmental isolates. *Mol Microb Ecol*. 2005:97-131.

179. Daffonchio D, Cherif A, Brusetti L, Rizzi A, Mora D, Boudabous A, Borin S. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(9):5128-5137.

180. Lupski JR, Weinstock GM. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol*. 1992;174(14):4525-4529.

181. Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol*. 1994;5(1):25-40.

182. Stern MJ, Ames GFL, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*. 1984;37(3):1015-1026.

183. Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol*. 1991;5(4):825-834.

184. Tobes R, Pareja E. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for insertion sequence elements. *BMC Genomics*. 2006;7:62.

185. Higgins CF, Ames GF, Barnes WM, Clement JM, Hofnung M. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature*. 1982;298(5876):760-762.

186. Gilson E, Clément JM, Brutlag D, Hofnung M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *EMBO J*. 1984;3(6):1417-1421.

187. Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, Andrew P, Prudhomme M, Alloing G, Hakenbeck R, Morrison DA, Boulnois GJ, Claverys JP. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(13):3479-3483.

188. Dahl MK, Francoz E, Saurin W, Boos W, Manson MD, Hofnung M. Comparison of sequences from the malB regions of *Salmonella typhimurium* and *Enterobacter aerogenes* with *Escherichia coli* K12: a potential new regulatory site in the interoperonic region. *Mol Gen Genet MGG*. 1989;218(2):199-207.

189. Higgins CF, McLaren RS, Newbury SF. Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion?-a review. *Gene*. 1988;72(1):3-14.

190. Ridley AM. Genomic Fingerprinting by Application of rep-PCR. In: Woodford N, Alan J, ed. *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications, Methods in Molecular Medicine, Volume 15*. Humana Press, New Jersey; 1998:103-117.

191. Charnavets T, Nunvar J, Nečasová I, Völker J, Breslauer KJ, Schneider B. Conformational diversity of single-stranded DNA from bacterial repetitive extragenic palindromes: Implications for the DNA recognition elements of transposases. *Biopolymers*. 2015;103(10):585-596.

192. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(24):6823-6831.

193. Doll L, Moshitch S, Frankel G. Poly(GTG)5-associated profiles of *Salmonella* and *Shigella* genomic DNA. *Res Microbiol*. 1993;144(1):17-24.

194. Rademaker JL, de Bruijn FJ. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. *DNA markers Protoc Appl overviews*. 1997;1:151-171.

195. Ishii S, Sadowsky MJ. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environ Microbiol*. 2009;11(4):733-740.

196. da Silva RB, Valicente FH. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR. *Springerplus*. 2013;2:641.

197. Woods CR, Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *J Clin Microbiol*. 1993;31(7):1927-1931.

198. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of

microbial organisms. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1661-1669.

199. Rademaker JLW, Louws FJ, Versalovic JV, de Bruijn FJ. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: Kowalchuck GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans ADL, van Elsas JD, eds. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht, the Netherlands: Springer; 2008:611-644.

200. Hiett KL, Seal BS. Use of repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) for the epidemiologic discrimination of foodborne pathogens. *Methods Mol Biol*. 2009;551:49-58.

201. Versalovic J, Woods CR Jr, Georghiou PR, Hamill RJ, Lupski JR. DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. *Arch Pathol Lab Med*. 1993;117:1088-1098.

202. Versalovic J, Lupski JR. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol*. 2002;10(10):s15-s21.

203. Versalovic JV, de Bruijn FJ, Lupski JR. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In: de Bruijn FJ, Lupski JR, Weinstock GM, eds. *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*. New York, NY, USA: Chapman & Hall; 1998:437-454.

204. Gevers D, Huys G, Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;205(1):31-36.

205. Inan K, Bektas Y, Canakci S, Belduz AO. Use of rpoB sequences and rep-PCR for phylogenetic study of *Anoxybacillus* species. *J Microbiol*. 2011;49(5):782-790.

206. Cihan AC, Ozcan B, Tekin N, Cokmus C. *Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus*, subsp. nov., a thermophilic and α-glucosidase producing bacterium isolated from Kizilcahamam, Turkey. *J Gen Appl Microbiol*. 2011;57(2):83-92.

207. Mora D, Fortina MG, Nicastro G, Parini C, Manachini PL. Genotypic characterization of thermophilic bacilli: a study on new soil isolates and several reference strains. *Res Microbiol*. 1998;149(10):711-722.

208. Guillaume-Gentil O, Scheldeman P, Marugg J, Herman L, Joosten H, Heyndrickx M. Genetic heterogeneity in *Bacillus sporothermodurans* as demonstrated by ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. *Appl Environ*

Microbiol. 2002;68(9):4216-4224.

209. Meintanis C, Chalkou KI, Kormas KA, Lymperopoulou DS, Katsifas EA, Hatzinikolaou DG, Karagouni AD. Application of rpoB sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillus*. *Lett Appl Microbiol*. 2008;46(3):395-401.

210. Deng W, Xi D, Mao H, Wanapat M. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Mol Biol Rep*. 2008;35(2):265-274.

211. Massol-Deya AA, Odelson DA, Hickey RF, Tiedje JM. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Akkermans ADL, Van Elsas JD, De Bruijn FJ, eds. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Springer Dordrecht Netherlands; 1995:289-296.

212. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(12):939-951.

213. Heyndrickx M, Vauterin L, Vandamme P, Kersters K, De Vos P. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J Microbiol Methods*. 1996;26(3):247-259.

214. Vaneechoutte M, Rossau R, De Vos P, Gills M, Janssens D, Paepe N, De Rouck A, Fiers T, Claeys G, Kersters K. Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Lett*. 1992;93(3):227-234.

215. Caccamo D, Maugeri TL, Gugliandolo C. Identification of thermophilic and marine bacilli from shallow thermal vents by restriction analysis of their amplified 16S rDNA. *J Appl Microbiol*. 2001;91(3):520-524.

216. Kuisiene N, Jomantiene R, Valiunas D, Chitavichius D. Characterization of thermophilic proteolytic spore-forming bacteria from a geothermal site in Lithuania based on 16S rDNA RFLP and ITS-PCR analyses. *Microbiology*. 2002;71(6):712-716.

217. Kuisiene N, Raugalas J, Čitavičius D. Identification of *Geobacillus stearothermophilus* by restriction digestion with AluI of the amplified 16S rRNA.

Biologija. 2007;53(4):62-66.

218. Johnson JL, Ordal EJ. Deoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. *J Bacteriol*. 1968;95:893-900.

219. Rosselló-Móra R, Amann R. The species concept for procaryotes. *FEMS Microbiol Ecol*. 2001;25:39-67.

220. Keswani J, Whitman WB. Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:667-678.

221. Mesbah NM, Whitman WB, Mesbah M. Determination of the G+C content of prokaryotes. In: Rainey FA, Oren A, eds. *Methods in Microbiology Volume 38 Taxonomy of Prokaryotes*. Elsevier Ltd; 2011:299-324.

222. Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol*. 1962;5(1):109-118.

223. Mesbah M, Premachandran U, Whitman W. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol*. 1989;39(2):159-167.

224. Xu HX, Kawamura Y, Li N, Zhao L, Li TM, Li ZY, Shu S, Ezaki T. A rapid method for determining the G+C content of bacterial chromosomes by monitoring fluorescence intensity during DNA denaturation in a capillary tube. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000;50(4):1463-1469.

225. De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem*. 1970;12(1):133-142.

226. Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C. A fluorimetric method for the estimation of G+C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. *Environ Microbiol*. 2002;4(11):770-773.

227. Hiteshi K, Gupta R. Thermal adaptation of α-amylases: a review. *Extremophiles*. 2014;18(6):937-944.

228. Van Der Maarel MJ, Van Der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. *J Biotechnol*. 2002;94(2):137-155.

229. Kumar P, Satyanarayana T. Microbial glucoamylases: characteristics and

applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2009;29(3):225-255.

230. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*. 1991;280(2):309-316.

231. Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*. 1993;293(3):781-788.

232. Henrissat B, Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J*. 1996;316(Pt 2):695-696.

233. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:D233-D238.

234. Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol*. 1997;7(5):637-644.

235. Stam MR, Danchin EG, Rancurel C, Coutinho PM, Henrissat B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α-amylase-related proteins. *Protein Eng Des Sel*. 2006;19:555-562.

236. Svensson B, Tovborg Jensen M, Mori H, Sass Bak-Jensen K, Bønsager B, Nielsen PK, Kramhøft B, Prætorius-Ibba M, Nøhr J, Juge N, Greffe L, Williamson G, Driguez H. Fascinating facets of function and structure of amylolytic enzymes of glycoside hydrolase family 13. *Biol Bratislava*. 2002;57(Sup11):5-19.

237. Janeček Š, Svensson B, Henrissat B. Domain evolution in the α-amylase family. *J Mol Evol*. 1997;45:322-331.

238. Macgregor EA. An overview of clan GH-H and distantly-related families. *Biol Bratislava*. 2005;60(Suppl. 16):5-12.

239. Gabrisko M, Janeček Š. Looking for the ancestry of the heavy-chain subunits of heteromeric amino acid transporters rBAT and 4F2hc within the GH13 α-amylase family. *FEBS J*. 2009;276:7265-7278.

240. Janeček Š, Svensson B, MacGregor EA. α-Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(7):1149-1170.

241. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D490–D495.

242. Janeček Š. How many conserved sequence regions are there in the α-amylase family? *Biologia (Bratisl)*. 2002;57(Sup11):29-41.

243. Kuriki T, Imanaka T. The concept of the α-amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J Biosci Bioeng*. 1999;87:557-565.

244. MacGregor EA, Janeček Š, Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α-amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 2001;1546(1):1-20.

245. Janeček Š. Amylolytic enzymes- focus on the alpha-amylases from archaea and plants. *Nov Biotechnol*. 2009;9(1):5-25.

246. Janeček Š, Kuchtová A, Petrovičová S. A novel GH13 subfamily of α-amylases with a pair of tryptophans in the helix α3 of the catalytic TIM-barrel, the LPDlx signature in the conserved sequence region V and a conserved aromatic motif at the C-terminus. *Biologia (Bratisl)*. 2015;70(10):1284-1294.

247. Mewis K, Lenfant N, Lombard V, Henrissat B. Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: a motivation for detailed enzyme characterization. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(6):1686-1692.

248. Adıgüzel AO. Biyoetanolün genel özellikleri ve üretimi için gerekli hammadde kaynakları. *BEU J Sci*. 2013;2(2):204-220.

249. Goyal N, Gupta JK, Soni SK. A novel raw starch digesting thermostable α-amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme Microb Technol*. 2005;37(7):723-734.

250. Zia F, Zia KM, Zuber M, Kamal S, Aslam N. Starch based polyurethanes: a critical review updating recent literature. *Carbohydr Polym*. 2015;134:784-798.

251. Horvathova V, Janeček Š, Sturdik E. Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties. *Biol Bratislava*. 2000;55(6):605-615.

252. Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*. 2003;89(1):17-34.

253. Matsuura Y, Kusunoki M, Harada W, Kakudo M. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J Biochem*. 1984;95:697-702.

254. Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, Corran PH, Furth AJ, Milman JD, Offord RE, Priddle JD, Waley SG. Structure of chicken

muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature*. 1975;255:609-614.

255. Marc JE, van der Maarel C, Joost BV, Uitdehaag CM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. *J Biotechnol*. 2002;94(2):137-155.

256. MacGregor EA. α-Amylase structure and activity. *J Protein Chem*. 1988;7:399-415.

257. Janeček Š. α-Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog Biophys Mol Biol*. 1997;67(1):67-97.

258. Sivaramakrishnan S, Gangadharan D, Nampoothiri KM, Soccol CR, Pandey A. α-Amylases from microbial sources - an overview on recent developments. F*ood Technol Biotechnol*. 2006;44(2):173-184.

259. Holm L, Koivula AK, Lehtovaara PM, Hemminki A, Knowles JKC. Random mutagenesis used to probe the structure and function of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Protein Eng*. 1990;3:181-191.

260. Zhang Q, Han Y, Xiao H. Microbial α-amylase: a biomolecular overview. *Process Biochem*. 2017;53:88-101.

261. Chai KP, Othman NFB, Teh AH, Ho KL, Chan KG, Shamsir MS, Goh KM, Ng CL. Crystal structure of *Anoxybacillus* α-amylase provides insights into maltose binding of a new glycosyl hydrolase subclass. *Sci Rep*. 2016;6:23126.

262. Mehta D, Satyanarayana T. Bacterial and archaeal α-amylases: diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications. *Front Microbiol*. 2016;7:1129.

263. Machovic M, Janeček Š. Amylolytic Enzymes: Types, Structures and Specificities. In: Polaina Julio, MacCabe AP, eds. *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*. Springer Netherlands; 2007:3-18.

264. Bissaro B, Monsan P, Fauré R, O'Donohue MJ. Glycosynthesis in a waterworld: new insight into the molecular basis of transglycosylation in retaining glycoside hydrolases. *Biochem J*. 2015;467(1):17-35.

265. Davies GJ, Wilson KS, Henrissat B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J*. 1997;321:557-559.

266. Uitdehaag J, Mosi R, Kalk K, van der Veen B, Dijkhuizen L, Withers S, Dijkstra B.

X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α-amylase family. *Nat Struct Biol*. 1999;6(5):432-436.

267. Tsusaki K, Nishimoto T, Nakada T, Kubota M, Chaen H, Fukuda S, Sugimoto T, Kurimoto M. Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Thermus aquaticus* ATCC33923. *Biochim Biophys Acta (BBA)-General Subj*. 1997;1334(1):28-32.

268. Janeček Š. New conserved amino acid region of alpha-amylases in the third loop of their (beta/alpha) 8-barrel domains. *Biochem J*. 1992;288(Pt 3):1069.

269. Janeček Š. Parallel β/α-barrels of α-amylase, cyclodextrin glycosyltransferase and oligo-1,6-glucosidase versus the barrel of β-amylase: evolutionary distance is a reflection of unrelated sequences. *FEBS Lett*. 1994;353:119-123.

270. Janeček Š. Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α-amylases. *Eur J Biochem*. 1994;224:519-524.

271. Janeček Š. Close evolutionary relatedness among functionally distantly related members of the (α/β) 8-barrel glycosyl hydrolases suggested by the similarity of their fifth conserved sequence region. *FEBS Lett*. 1995;377(1):6-8.

272. Toda H, Kondo K, Narita K. The complete amino acid sequence of Taka-amylase A. *Proc Japan Acad Ser B*. 1982;58(7):208-212.

273. Friedberg F. On the primary structure of amylases. *FEBS Lett*. 1983;152(2):139-140.

274. Rogers JC. Conserved amino acid sequence domains in alpha-amylases from plants, mammals, and bacteria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985;128(1):470-476.

275. Nakajima R, Imanaka T, Aiba S. Comparison of amino acid sequences of eleven different α-amylases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1986;23:355-360.

276. Svensson B. Protein engineering in the α-amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol Biol*. 1994;25(2):141-157.

277. Prakash O, Jaiswal N. α-Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160(8):2401-2414.

278. Nielsen AD, Pusey ML, Fuglsang CC, Westh P. A proposed mechanism for the thermal denaturation of a recombinant *Bacillus halmapalus* α-amylase-the effect of calcium ions. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Proteins Proteomics*. 2003;1652(1):52-

63.

279. Sajedi RH, Taghdir M, Naderi-Manesh H, Khajeh K, Ranjbar B. Nucleotide sequence, structural investigation and homology modeling studies of a Ca^{2+}-independent α-amylase with acidic pH-profile. *BMB Rep*. 2007;40(3):315-324.

280. Koshland DE. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol Rev*. 1953;28(4):416-436.

281. Burhan A, Nisa U, Gökhan C, Ömer C, Ashabil A, Osman G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem*. 2003;38:1397-1403.

282. Çöleri A. B*azı termofilik Bacillus türlerinin termostabil α-glukozidaz üretim kapasiteleri ve enzim/lerin kısmi karakterizasyonu* [doktora tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü; 2007.

283. Malhotra R, Noorvez S, Satyanarayana T. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett Appl Microbiol*. 2000;31(5):378-384.

284. Narang S, Satyanarayana T. Thermostable α-amylase production by an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans*. *Lett Appl Microbiol*. 2001;32(1)(31-35).

285. Janeček Š, Baláž Š. α-Amylases and approaches leading to their enhanced stability. *FEBS Lett*. 1992;304(1):1-3.

286. Klein C, Schulz GE. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. 1991; *J Mol Biol*. 1991;217:737-50.

287. Han R, Li J, Shin HD, Chen RR, Du G, Liu L, Chen J. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. *Biotechnol Adv*. 2014;32(2):415-428.

288. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):235-242.

289. Lawson CL, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom HJ, Kalk KH, de Vries GE, Penninga D, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *J Mol Biol*. 1994;236:590-600.

290. Goh PH, Illias RM, Goh KM. Rational mutagenesis of cyclodextrin

glucanotransferase at the calcium binding regions for enhancement of thermostability. *Int J Mol Sci*. 2012;13(5):5307-5323.

291. Leemhuis H, Rozeboom HJ, Dijkstra BW, Dijkhuizen L. Improved thermostability of *Bacillus circulans* cyclodextrin glycosyltransferase by the introduction of a salt bridge. *Proteins*. 2004;54:128-134.

292. Goh PH, Illias RM, Goh KM. Domain replacement to elucidate the role of B domain in CGTase thermostability and activity. *Process Biochem*. 2012;47:2123-2130.

293. Penninga D, van der Veen BA, Knegtel RM, van Hijum SA, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkstra BW, Dijkhuizen L. The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. *J Biol Chem*. 1996;271:32777-32784.

294. Dalmia BK, Schutte K, Nikolov Z. Domain E of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase: an independent starch-binding domain. *Biotechnol Bioeng*. 1995;47:575-584.

295. Chang HY, Irwin PM, Nikolov ZL. Effects of mutations in the starch-binding domain of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase. *J Biotechnol*. 1998;65(2):191-202.

296. Machovic M, Janeček Š. Starch-binding domains in the post-genome era. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63:2710-2724.

297. Svensson B, Jespersen H, Sierks MR, MacGregor EA. Sequence homology between putative raw-starch binding domains from different starch-degrading enzymes. *Biochem Journal,*. 1989;264(1):309-311.

298. Villette JR, Krzewinski FS, Looten PJ, Sicard PJ, Bouquelet SJL. Cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E-192.4. Evidence for a raw starch-binding site and its interaction with a L-cyclodextrin copolymer. *Biotechnol Appl Biochem*. 1992;16(1):57-63.

299. Lawson CL, Bergsma J, Bruinenberg PM, De Vries G, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. Maltodextrin-dependent crystallization of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*. *J Mol Biol*. 1990;214(4):807-809.

300. Hyun-Dong S, Park TH, Lee YH. Site-directed mutagenesis and functional analysis of maltose-binding site of β-cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*

var. *alkalophilus*. *Biotechnol Lett*. 2000;22(2):115-121.

301. Kelly RM, Dijkhuizen L, Leemhuis H. The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;84:119-133.

302. Leemhuis H, Kelly RM, Dijkhuizen L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;85(4):823-835.

303. van der Veen BA, van Alebeek GJW, Uitdehaag J, Dijkstra BW, Dijkhuizen L. The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms. *Eur J Biochem*. 2000;267:658-665.

304. Uitdehaag JC, van der Veen BA, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. Catalytic mechanism and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase, a prototypical transglycosylase from the α-amylase family. *Enzyme Microb Technol*. 2002;30(3):295-304.

305. Tachibana Y, Takaha T, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T. Acceptor specificity of 4-alpha-glucanotransferase from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1, and synthesis of cycloamylose. *J Biosci Bioeng*. 2000;90:406-409.

306. Kumar V. Analysis of the key active subsites of glycoside hydrolase 13 family members. *Carbohydr Res*. 2010;345:893-898.

307. Han R, Liu L, Shin HD, Chen RR, Du G, Chen J. Site-saturation engineering of lysine 47 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* to enhance substrate specificity towards maltodextrin for enzymatic synthesis of 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G). *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:5851-5860.

308. Liu L, Xu Q, Han R, Shin HD, Chen RR, Li J, Du G, Chen J. Improving maltodextrin specificity for enzymatic synthesis of 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid by site-saturation engineering of subsite-3 in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*. *J Biotechnol*. 2013;166(4):198-205.

309. Leemhuis H, Uitdehaag JC, Rozeboom HJ, Dijkstra BW, Dijkhuizen L. The remote

substrate binding subsite -6 in cyclodextrin glycosyltransferase controls the transferase activity of the enzyme via an induced-fit mechanism. *J Biol Chem*. 2002;277:1113-9.

310. Uitdehaag JC, van der Veen BA, Dijkhuizen L, Elber R, Dijkstra B. Enzymatic circularization of a malto-octaose linear chain studied by stochastic reaction path calculations on cyclodextrin glycosyltransferase. *Proteins*. 2001;43:327-335.

311. Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem*. 2004;39(9):1033-1046.

312. Kelly RM, Leemhuis H, Rozeboom HJ, Van Oosterwijk N, Dijkstra BW, Dijkhuizen L. Elimination of competing hydrolysis and coupling side reactions of a cyclodextrin glucanotransferase by directed evolution. *Biochem J*. 2008;413(3):517-525.

313. Kitahata S, Tsuyama N, Okada S. Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species. *Agric Biol Chem*. 1974;38(2):387-393.

314. Takano T, Fukuda M, Monma M, Kobayashi S, Kainuma K, Yamane K. Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing, and expression in *Bacillus subtilis* cells of the *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene. *J Bacteriol*. 1986;166:1118-1122.

315. Zheng M, Endo T, Zimmermann W. Enzymatic synthesis and analysis of large-ring cyclodextrins. *Aust J Chem*. 2002;55:39-48.

316. Abelian VA, Afyan KB, Avakian ZG, Melkumyan AG, Afrikian EG. Cyclomaltodextrin glucotransferases from thermophilic actinomycetes. *Biochem York-English Transl Biokhimiya*. 1995;60(10):1223-1230.

317. Chung HJ, Yoon SH, Lee MJ, Kim MJ, Kweon KS, Lee I-W, Kim J-W, Oh B-H, Lee H-S, Spiridonova VA, Park K-H. Characterization of a thermostable cyclodextrin glucanotransferase isolated from *Bacillus stearothermophilus* ET1. *J Agric Food Chem*. 1998;46:952-959.

318. Go YH, Kim TK, Lee KW, Lee Y. Functional characteristics of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. BL-31 highly specific for intermolecular transglycosylation of bioflavonoids. *J Microbiol Biotechnol*.

2007;17:1550-1553.

319. Atanasova N, Petrova P, Ivanova V, Yankov D, Vassileva A, Tonkova A. Isolation of novel alkaliphilic *Bacillus* strains for cyclodextrin glucanotransferase production. *Appl Biochem Biotechnol*. 2008;149:155-167.

320. Kitayska T, Petrova P, Ivanova V, Tonkova A. Purification and properties of a new thermostable cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus pseudalcaliphilus* 8SB. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;165:1285-1295.

321. Petrova P, Tonkova A, Petrov K. Sequence analysis, cloning and extracellular expression of cyclodextrin glucanotrasferase gene from the alkaliphilic *Bacillus pseudalcaliphilus* 8SB in *E. coli*. *Process Biochem*. 2012;47:2139-2145.

322. Yenpetch W, Packdibamrung K, Zimmermann W, Pongsawasdi P. Evidence of the involvement of asparagine deamidation in the formation of cyclodextrin glycosyltransferase isoforms in *Paenibacillus* sp. RB01. *Mol Biotechnol*. 2011;47:234-242.

323. Ibrahim AS, Al-Salamah AA, El-Tayeb MA, El-Badawi YB, Antranikian G. A novel cyclodextrin glycosyltransferase from alkaliphilic *Amphibacillus* sp. NPST-10: purification and properties. *Int J Mol Sci*. 2012;13:10505–22.

324. Fujiwara S, Kakihara H, Sakaguchi K, Imanaka T. Analysis of mutations in cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and thermostability. *J Bacteriol*. 1992;174:7478-7481.

325. Harata K, Haga K, Nakamura A, Aoyagi M, Yamane K. X-ray structure of cyclodextrin glucano-transferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011. Comparison of two independent molecules at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 1996;52(6):1136-1145.

326. Penninga D, Strokopytov B, Rozeboom HJ, Lawson CL, Dijkstra BW, Bergsma J, Dijkhuizen L. Site-directed mutations in tyrosine 195 of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 affect activity and product specificity. *Biochemistry*. 1995;34(10):3368-3376.

327. Nakamura A, Haga K, Yamane K. Four aromatic residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011: effects of replacements on substrate binding and cyclization characteristics. *Biochemistry*.

1994;33:9929-9936.

328. Wind RD, Uitdehaag JC, Buitelaar RM, Dijkstra BW, Dijkhuizen L. Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. *J Biol Chem*. 1998;273:5771–9.

329. Yamamoto T, Fujiwara S, Tachibana Y, Takagi M, Fukui K, Imanaka T. Alteration of product specificity of cyclodextrin glucanotransferase from *Thermococcus* sp. B1001 by site-directed mutagenesis. *J Biosci Bioeng*. 2000;89(2):206-209.

330. Rashid N, Cornista J, Ezaki S, Fukui T, Atomi H, Imanaka T. Characterization of an archaeal cyclodextrin glucanotransferase with a novel C-terminal domain. *J Bacteriol*. 2002;184(3):777-784.

331. Janeček Š, MacGregor EA, Svensson B. Characteristic differences in the primary structure allow discrimination of cyclodextrin glucanotransferases from alpha-amylases. *Biochem J*. 1995;305 (Pt 2):685-686.

332. Janeček Š. Tracing the evolutionary lineages among alpha-amylases and cyclodextrin glycosyltransferases: the question of so-called "intermediary" enzymes. *Biologia (Bratisl)*. 1995;50(6):515-522.

333. Coleri A, Cokmus C, Ozcan B, Akkoc N, Akcelik M. Isolations of α-glucosidase-producing thermophilic bacilli from hot springs of Turkey. *Microbiology*. 2009;78(1):56-66.

334. Donk PJ. A highly resistant thermophilic organism. *J Bacteriol*. 1920;5(4):373.

335. Suzuki Y, Kishigami T, Inoue K, Mizoguchi Y, Eto N, Takagi M, Abe S. *Bacillus thermoglucosidasius* sp. nov., a new species of obligately thermophilic bacilli. *Syst Appl Microbiol*. 1983;4(4):487-495.

336. Fukumoto J. Studies on the production of bacterial amylase. II. Bacterial and physiological nature. *Nippon Nogei Kaggakai*. 1943;19:643-650.

337. Fukumoto J. Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylase and their distribution. *Nippon Nogei Kaggakai*. 1943;19:487-503.

338. Priest FG, Goodfellow M, Shute LA, Berkeley RCW. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol*. 1987;37:69-71.

339. Wang LT, Lee FL, Tai CJ, Kuo HP. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58(3):671-675.

340. Suzuki Y, Kishigami T, Abe S. Production of extracellular α-glucosidase by a thermophilic *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol*. 1976;31(6):807-812.

341. Suzuki Y, Yuki T, Kishigami T, Abe S. Purification and properties of extracellular α-glucosidase of a thermophile, *Bacillus thermoglucosidius* KP 1006. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Enzymology*. 1976;445(2):386-397.

342. Santos EO, Martins MLL. Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp. *Braz Arch Biol Technol*. 2003;46:129-134.

343. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 2007;23(10):1289-1291. Available at: http://primer3.ut.ee.

344. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(15):e115. Available at: http://primer3.ut.ee.

345. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28(12):1647-1649. Available at: http://www.geneious.com.

346. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-410. Available at: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

347. Marchler-Bauer A, Bryant SH. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res*. 2004;32 (W):327-331. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi.

348. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725-2729.

349. Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst*

Biol. 2011;7(1):539. Available at: https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/.

350. NCBI Banklt. National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD USA 20894. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank. Accessed March 6, 2017.

351. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res*. 2004;14:1188-1190.

352. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991;173(2):697-703.

353. Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016. Available at: http://www.ezbiocloud.net.

354. Thompson JD, Collins MD, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sewuence weighting position-spesific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673-4680.

355. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16(2):111-120.

356. Saitou N, Nei M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4(4):406-425.

357. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985;39:783-791.

358. Claus D, Berkeley CW. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: Sneath P, ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Baltimore, The Williams and Wilkins Co.; 1986:1105-1139.

359. Logan NA, Berkeley CW. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *Microbiology*. 1984;130(7):1871-1882.

360. Miller LT. A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids. *J Clin Microbiol*. 1982;16(3):584-586.

361. Kuykendall LD, Roy MA, O'Neill JJ, Devine TE. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int J*

Syst Bacteriol. 1988;38:358-361.

362. Tindall BJ. A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Syst Appl Microbiol*. 1990;13:128-130.

363. Tindall BJ. Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Letts*. 1990;66:199-202.

364. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37:911-917.

365. Tindall BJ, Sikorski J, Smibert RM, Kreig NR. Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In: Reddy CA, Beveridge TJ, Breznak JA, Marzluf G, Schmidt TM, Snyder LR, eds. *Methods for General and Molecular Microbiology*. 3rd edn. ASM Press, Washington DC, USA; 2007:330-393.

366. Cashion P, Hodler-Franklin MA, McCully J, Franklin M. A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem*. 1977;81(2):461-466.

367. Tamaoka J, Komagata K. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett*. 1984;25(1):125-128.

368. Huss VAR, Festl H, Schleifer KH. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaation rates. *Syst Appl Micturrobiol*. 1983;4(2):184-192.

369. Miller GL. Use of dinitro-salicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*. 1959;31:426-428.

370. Halvorson H. α-Glucosidase from yeast. *Methods Enzymol*. 1966;8:559-562.

371. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: Munro HN, ed. *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York; 1969:21-132.

372. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement CLSI Document M100-S17 (ISBN 1-56238-625-5). Clinical Laboratory Standards Institute, Table 3*. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA; 2007.

373. ENDMEMO DNA/RNA GC Content Calculator. Available at: http://www.endmemo.com/bio/tm.php. Accessed March 6, 2017.

374. Puspasari F, Radjasa OK, Noer AS, Nurachman Z, Syah YM, Maarel M, Dijkhuizen

L, Janeček Š, Natalia D. Raw starch-degrading α-amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2: isolation and expression of the gene, bioinformatics and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *J Appl Microbiol*. 2013;114 (1):108-120.

375. Ranjani V, Janeček Š, Chai KP, Shahir S, Rahman RNZRA, Chan KG, Goh KM. Protein engineering of selected residues from conserved sequence regions of a novel *Anoxybacillus* α-amylase. *Sci Rep*. 2014;4:5850.

376. Mok SC, Teh AH, Saito JA, Najimudin N, Alam M. Crystal structure of a compact α-amylase from *Geobacillus thermoleovorans*. *Enzyme Microb Technol*. 2013;53(1):46-54.

377. Nakamura A, Haga K, Yamane K. Three histidine residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011: effects of the replacement on pH dependence and transition-state stabilization. *Biochemistry*. 1993;32(26):6624-6631.

378. Strokopytov B, Knegtel RM, Penninga D, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a maltononaose inhibitor at 2.6 Å resolution. Implications for product specificity. *Biochemistry*. 1996;35(13):4241-4249.

379. van der Veen BA, Leemhuis H, Kralj S, Uitdehaag JC, Dijkstra BW, Dijkhuizen L. Hydrophobic amino acid residues in the acceptor binding site are main determinants for reaction mechanism and specificity of cyclodextrin-glycosyltransferase. *J Biol Chem*. 2001;276(48):44557-44562.

380. Declerck N, Machius M, Wiegand G, Huber R, Gaillardin C. Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* α-amylase. *J Mol Biol*. 2000;301:1041-1057.

381. Chi M-C, Chen Y-H, Wu T-J, Lo H-F, Lin, L-L. Engineering of a truncated α-amylase of *Bacillus* sp. strain TS-23 for the simultaneous improvement of thermal and oxidative stabilities. *J Biosci Bioeng*. 2010;109:531-538.

382. Oslancova A, Janeček Š. Oligo-1,6-glucosidase and neopullulanase enzyme subfamilies from the α-amylase family defined by the fifth conserved sequence region. *Cell Mol life Sci*. 2002;59(11):1945-1959.

383. Finore I, Kasavi C, Poli A, Romano I, Oner ET, Kirdar B, Dipasquale L, Nicolaus B, Lama L. Purification, biochemical characterization and gene sequencing of a thermostable raw starch digesting α-amylase from *Geobacillus thermoleovoran*s subsp. *stromboliensis* subsp. nov. *World J Microbiol Biotechnol*. 2011;27(10):2425-2433.

384. Mehta D, Satyanarayana T. Domain C of thermostable α-amylase of *Geobacillus thermoleovorans* mediates raw starch adsorption. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(10):4503-4519.

385. Ballschmiter M, Armbrecht M, Ivanova K, Antranikian G, Liebl W. AmyA, an α-amylase with β-cyclodextrin-forming activity, and AmyB from the thermoalkaliphilic organism *Anaerobranca gottschalkii*: two α-amylases adapted to their different cellular localizations. Appl Environ Microbiol. 2005;71(7):3709-3715.

8. EKLER

EK-1

Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Makine-Teçhizat Listesi

Makine-Teçhizat Adı	Markası	Kullanım Amacı
Masaüstü otoklav	Nüve, OT020 model	Besiyeri, çözelti, tampon ve pipet uçlarının sterilizasyonu
Büyük boy otoklav	Prior Clave Midas 55	Besiyeri, çözelti, tampon ve pipet uçlarının sterilizasyonu
Fırın	Dedeoğlu	Cam malzemelerin sterilizasyonu
Çalkalamalı inkübatör	Shellab	Bakteri kültürlerinin üretilmesi
pH metre	Hanna	Besiyeri, çözelti ve tamponların pH'larının ayarlanması
Manyetik karıştırıcı	Isolab	Sıvı besiyeri, çözelti ve kimyasalların karıştırılarak çözülmesi
Vorteks	Isolab	Sıvı besiyeri, çözelti ve kimyasalların karıştırılması
Soğutmalı santrifüj	Hettich (Micro 22R)	Çöktürme işlemleri (biyokütle eldesi)
Hassas terazi	Scaltec	Kimyasal madde ve bakteri kültürlerinin tartımı
Su banyosu	Clifton	Enzim aktivite deneylerinin gerçekleştirilmesi
Ultra saf su cihazı	Millipore Direct Q3	Ultra saf su eldesi
UV visible Mikroplate okuyucu	BioTek Instruments (µQuant)	Spektrofotometrik olarak miktar tayini (Enzim aktivitesi deneylerinde)
NanoDrop Spektrofotometre cihazı	Thermo Scientific Nanodrop ND-1000	DNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi (ölçümler Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Merkez Laboratuvarında yapılmıştır)
Thermal cycler cihazı	Applied Biosystems Veriti	PCR reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi
Jel görüntüleme ve analiz sistemi	Vilber-Loumart (Quantum-capt)	Agaroz jellerin görüntülenmesi
Mikrodalga fırın	Arçelik	Agaroz jellerin homojenizasyonu
Maksi boy yatay agaroz jel elektroforez tankı	(TermoFisher Scientific, 15x25 cm)	Büyük hacimde agaroz jel elektroforezi
Mini yatay agaroz jel elektroforez tankı	(TermoFisher Scientific, 12x14 cm, OWL-B2-CST)	Küçük hacimde agaroz jel elektroforezi
Güç kaynağı	Hoefer	Elektroforez işlemlerinde güç kaynağı
Işık Mikroskobu	Olympus CX21	Gram boyama ile hazırlanmış preparatların mikroskobik analizi (hareketliliğin belirlenmesi)
Faz Kontrast Mikroskobu	Olympus BX51	Bakterilerin mikroskobik analizi (hücre morfoloji ve boyutlarının, spor şekli ve pozisyonunun belirlenmesi)
Mikropipet seti	Gilson Pipetmen Classic, Eppendorf	1000 µL'ye kadar hacimdeki sıvıların aktarılması
50-100 µL'lik çok kanallı mikropipet	Gilson	Küçük hacimlerdeki birden fazla örneğin aynı anda pipetlenmesi
Buzdolabı (+4°C)	Indesit ve Bosch	Bakteri izolatlarının ve kimyasalların saklanması
Derin dondurucu (-20°C)	Indesit	DNA, protein örnekleri, bazı materyal ve kimyasalların saklanması

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Emine Derebay Yıldız

Doğum Yeri ve Tarihi: Uşak, 04.08.1980

Medeni Durumu: Evli

Yabancı Dili: İngilizce (ÜDS:92, KPDS:80, YÖKDİL:85)

Eğitim Durumu

Lise: Uşak Anadolu Lisesi (1991-1998)

Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD (1998-2002)

Yüksek Lisans: Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2002-2005)

İş Tecrübesi

- **Kurumu:** TÜBİTAK, ARDEB-TBAG

Görevi: Bilimsel Programlar Uzman Yardımcısı **Yılları:** Mart 2006-Nisan 2011

- **Kurumu:** TÜBİTAK, ARDEB-TBAG/KBAG

Görevi: Bilimsel Programlar Uzmanı **Yılları:** Nisan 2011-devam

Akademik Faaliyetler

E. Derebay, F. Şentürk Akfırat, T. Yıldırım, İ.Y. Sezen, Cell secreting anti-CEA antibody molecules: 8B6 and 8E1. 31st FEBS Congress, The FEBS Journal, Volume 273, Supplement 1, p. 304, 24-29 June 2006, İstanbul, Türkiye.

Doktora Öncesi Yayınlar

Yildirim T, Senturk Akfirat F, **Derebay E,** Sezen IY. Mab against carcinoembryonic antigen (CEA*). Hybridoma*. 2005;24(6):319-320.

Sezen, İ.Y., Yıldırım, T., Şentürk Akfırat, F., Gül Şeker, M., **Derebay, E.** Hibridoma teknolojisi, monoklonal antikorların üretimi. Gümüşel F., Sezen İ.Y., Akçin A. (eds.), Biyoteknoloji ve Endüstriyel Uygulama Alanları, Lisansüstü Eğitim Semineri, GYTE Basımevi, Gebze, 17-28 Eylül, 2002.

Projeler

Karsinoembriyonik antijene karşı monoklonal antikor üretimi, Gebze Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 3.000-TL, 15.02.2002-15.02.2004, Bursiyer (tamamlandı).

Termofilik *Anoxybacillus* türlerinin alfa-amilaz genlerinde yapısal ve işlevsel ve genomik çalışmalar, Hızlandırılmış Destek Projesi, 16H0430019, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, 09.11.2016-09.11.2017, Araştırmacı (devam ediyor).

Sertifika Eğitim Programları

Floresan Temelli Yeni Nesil Genetik Analiz Uygulamaları: DNA Dizi Analizi, Moleküler Markör Uygulamaları ve Çoklu Gen Anlatım Analizleri Uygulamalı Eğitimi, TÜBİTAK-MAM GMBE, Gebze-Kocaeli, 20-24 Haziran 2011.

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Ozel PB, Kilic T, Karaca B, Yildiz ED, Cokmus C, Cihan AC. Productive Biofilms From Mesophilic To Thermophilic Endospore-Forming Bacilli For Industrial Applications. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2017; 7(1):14-21.

JMBFS
Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences
International peer-reviewed scientific online journal
Published by Faculty of Biotechnology and Food Sciences

PRODUCTIVE BIOFILMS FROM MESOPHILIC TO THERMOPHILIC ENDOSPORE-FORMING BACILLI FOR INDUSTRIAL APPLICATIONS

Piril Beste Ozel[1], Tugba Kilic[1], Basar Karaca[1], Emine Derebay Yildiz[2], Cumhur Cokmus[3] and Arzu Coleri Cihan[1]*

Address(es):
[1] Ankara University, Faculty of Science, Biology Department, 06100, Tandogan, Ankara, Turkey, +90 312 212 6720/1095.
[2] Ankara University, Biotechnology Institute, 06500, Ankara, Turkey, +90 312 222 5826.
[3] Konya Food and Agriculture University, Dede Korkut Mahallesi, Beyşehir Cad. No: 9, 42080, Meram, Konya, Turkey, +90(332) 223 5488.

*Corresponding author: acihan@science.ankara.edu.tr

doi: 10.15414/jmbfs.2017.7.1.14-21

ARTICLE INFO

Received 28. 11. 2016
Revised 17. 4. 2017
Accepted 24. 5. 2017
Published 1. 8. 2017

Regular article

OPEN ACCESS

ABSTRACT

The basic biofilm characteristics and extracellular polymeric substances (EPSs) production of *Bacillus licheniformis* E114 (mesophile), *Bacillus pumilus* D75b, *Brevibacillus thermoruber* B93 (facultative thermophile) and *Anoxybacillus caldiproteolyticus* D621 (thermophile) isolates were evaluated in this study. They were initially investigated in terms of their pellicle formation at the air-liquid interface, complex carbohydrate production in TSA (Tryptic Soy Agar) medium supplemented with calcofluor dye, and also colony morphologies in TSA medium supplemented with Congo Red dye. Their biofilm productions on abiotic surfaces such as polystyrene and stainless steel were also quantified by crystal violet binding assay and viable cell enumerations. The ideal way for the mechanical removal of the adherent cells from the steel surface such as bead vortexing or scraping were also tested for each isolate. The optimal growth and biofilm production parameters of E114, D75b, B93, and D621 in terms of pH, NaCl, and temperature were determined. Under optimal conditions, their EPSs components such as carbohydrate, protein, and eDNA were also measured quantitatively. The isolates evaluated in this study presented colony morphotypes in different characteristics on Congo Red agar that display also unique biofilm forming capacities for each isolate. Also, useful optimization approaches were determined that might be adapted to potential industrial applications for the biofilm and EPSs producers. According to these findings, four different endospore-forming bacilli exhibiting mesophilic to thermophilic growth, and biofilm production, possessing various EPSs contents which may be novel were elucidated that could be important in many industrial processes.

Keywords: Biofilm production, endospore-forming bacilli, EPSs, facultative thermophilic, mesophilic, thermophilic

INTRODUCTION

Biofilm is defined as aggregated cells embedded in slime like extracellular polymeric substances (EPSs) which adhere to each other or to a surface. Therefore, biofilm generation on a surface is directly related with the EPSs production which constructs the complex three dimensional structures of biofilm **(Teh *et al*., 2015)**. During the last decade, many improvements have been made in discovering new microbial extracellular substances that possess novel industrial importance. These biological polymers have importance especially in medicine, pharmacology, agriculture, and packaging as well as in waste management **(Vert *et al*., 2012)**.
Members from *Bacillaceae* family are very divergent in the worldwide and comprise many species which display various characteristics in terms of growth parameters such as temperature, pH, and salinity requirements. Moreover, *Bacillaceae* family members are able to produce endospores that are resistant to unfavourable life conditions, and they can survive under extreme environmental conditions. These endospore-forming bacilli were classified into 3 groups according to their temperature requirements; the mesophiles (T_{opt}: 30-40°C), the facultative thermophiles (T_{opt}: 40-50°C), and the thermopiles (T_{opt}: 50- ≥70°C) **(Nazina *et al*., 2001; Cihan *et al*., 2012)**.
The diversity of *Bacillaceae* family members throughout the world is not only due to their endospore-forming capabilities, but also depends on their biofilm and EPSs production abilities in their natural habitats. Despite their spectacular diversity, only some of the specific species belonging to *Bacillaceae* members from genus *Bacillus* **(Parkar *et al*., 2001; Doroshenko *et al*., 2001; Ronimus *et al*., 2003; Lazarevic *et al*., 2005; Veening *et al*., 2006; Coorevits *et al*., 2008)**, *Brevibacillus* **(Bihari *et al*., 2010; Radchenkova *et al*., 2011; Yasar Yildiz *et al*., 2015)**, *Paenibacillus* **(Ben-Jacob and Cohen, 1998; Scheldeman *et al*., 2005; Burgess *et al*., 2009)**, *Anoxybacillus* **(Parkar *et al*., 2001; Burgess *et al*., 2009; Palmer *et al*., 2010; Dai *et al*., 2011)**, *Geobacillus* **(Parkar *et al*., 2001; Flint *et al*., 2001; Arena *et al*., 2009; Kambourova *et al*., 2009)**, *Aeribacillus* **(Burgess *et al*., 2009; Yasawong *et al*., 2011; Radchenkova *et al*., 2013)**, *Lysinibacillus*, *Oceanobacillus*, and *Ureibacillus* **(Coorevits *et al*., 2008; Burgess *et al*., 2009)** were focused either because of their biofilm characteristics or their EPSs components and the presence of their spores in some dairy products. However, there is limited information in terms of their differences in biofilm formation and the effect of temperature on this process. Hence, four different biofilm producer species from *Bacillaceae* family which display mesophilic (*B. pumilus* D75b), facultative thermophilic (*B. licheniformis* E114, *B. thermoruber* B93) and thermophilic (*A. caldiproteolyticus* D621) growth were evaluated in detailed for their basic biofilm formation characteristics. Thus, this study is the first which compares the endospore-forming bacilli displaying mesophilic to thermophilic growth in terms of their biofilm characterizations as well as the relationship between their biofilms and some surfaces/interfaces. Consequently, all these findings showed that our bacterial isolates have strong biofilm producers with their EPSs contents which might be promising for many industrial applications.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates

Biofilm producing and endospore-forming bacilli of E114 (a water sample of Kozakli hot spring, Nevsehir), D75b (a sediment sample of Balcova geothermal power plant, Izmir), B93 (a soil sample of Turgutlu hot spring, Manisa) and D621 (a soil sample from Dikili-Kaynarca hot spring, Izmir) isolates were obtained from different geothermal regions of Turkey previously **(Coleri *et al*., 2009)**. The isolates were stored at -86°C in Medium I (MI) broth cultures supplemented with 20% glycerol **(Suzuki *et al*. 1996)**. The taxonomic data of these endospore-forming bacilli were previously presented in detail according to their phenotypic characteristics, 16S rRNA gene sequences and genomic fingerprinting profiles **(Cihan *et al*., 2011; Cihan *et al*., 2012; Koc *et al*., 2015)**.

In these studies, the 16S rRNA gene sequence analyses revealed that E114, D75b, B93 and D621 all belong to *Bacillaceae* family from *B. licheniformis* DSM13^T, *B. pumilus* DSM 27^T, *B. thermoruber* DSM 7064^T and *A. caldiproteolyticus* DSM 15730^T **(Cihan *et al*., 2011; Cihan *et al*., 2012)**. The isolates were categorized as mesophilic (E114, optimum growth at 35°C), facultative thermophilic (D75b: optimum growth at 50°C, and B93: optimum growth at 50°C) and thermophilic (D621, optimum growth at 55°C) according to their temperature requirements. The isolates of D75b and B93 were also found to be halotolerant. It was revealed that, these four isolates are able to produce a great amount of pellicle in the air-liquid interface of MI broth. Since the presence of a pellicle formation is a hint for biofilm production, these isolates were considered to be studied for their capability of biofilm formation and EPSs production for further studies.

Biofilm growth conditions

Prior to the biofilm assays, a series of culture enrichment was carried out. An overnight bacterial culture on Tryptic Soy Agar (TSA), (Merck, Germany) was inoculated into Tryptic Soy Broth (TSB), (Merck, Germany) and incubated at 37°C (for mesophilic E114), 45°C (for facultative thermophiles of D75b and B93) and 55-65°C (for thermophilic D621) for 18 h at 170 rpm. This turbid culture was again transferred into a new TSB and grown at appropriate temperature for additional 6 h. The 6 h-old final cultures in the logarithmic growth phase were used for entire biofilm assays.

Determination of pellicle formation

Pellicle development assay was performed in 5 mL of TSB without NaCl after inoculated with 100 µl of the enriched culture. The incubation was carried out at 37°C, 45°C or 55°-65°C for 4 days under static conditions. The test tubes were visually examined every day for the ring and pellicle formation at the liquid-air interface **(Kobayashi, 2007)**.

Determination of the complex carbohydrates on calcofluor containing medium and bacterial motility assay

The level of fluorescent brightener calcofluor binding to β(1-3)-D- or β(1-4)-D-linkages was assessed for the determination of the presence of carbohydrates such as cellulose or its derivate in the EPSs matrix. After culture enrichment, 50 µL of the bacterial isolate was dropped onto TSA without NaCl containing 50 mg/L calcofluor (Sigma-Aldrich, USA) and incubated at appropriate temperature for 48 h. Calcofluor binding was detected under UV light lamp. The results were photographed and presented as positive or negative according to the presence of fluorescence. As negative control *Salmonella infantis* DMC12 was used **(Zogaj *et al*., 2001)**. The flagella staining were performed by using BD Flagella Stain Droppers Kit (USA).

Determination of biofilm morphotype on Congo Red Agar (CR)

Congo red was used to observe the colony morphotypes and colour as well as to detect the amyloid fibres like curli **(Romero *et al*., 2010)**. Biofilm morphotypes were identified on the TSA without NaCl containing 40 mg/L Congo red (Sigma-Aldrich, USA). The enriched bacterial culture was dropped onto the same plate with 20, 30, 40 and 50 µL of culture volumes and incubated for 4 days under static conditions. The changes in the diameter, morphology and colour of the colonies were observed. In addition, at the second and fourth days of incubation, the colonies were also photographed by using stereomicroscope with a 0.63X magnification **(Römling and Rohde, 1999; Milanov *et al*., 2015a)**.

Microtiter plate assay

The crystal violet binding assay was performed based on a modified protocol described previously **(Stepanović *et al*., 2000)**. After the culture enrichment, a portion of 10 µL was transferred to each well of U-bottom polystyrene microtiter plates having 96-wells (LP, Italy) containing 190 µL of TSB without NaCl and plates were incubated statically for 48-96 h, at appropriate temperatures. After incubation, all the planktonic cells were removed by gently washing the wells with serum *physiologic* (SP). Adherent cells were fixed with 200 µL of 95% methanol, incubated at room temperature for 15 min, and then emptied and dried at room temperature for additional 15 min. Each well was filled with 1% (w/v) crystal violet solution (200 µL), (Merck, Germany) and incubated for 30 min at room temperature. Finally, the plates were rinsed under running tap water. The dye bounded to adherent cells was resolubilized with ethanol:acetone (70:30 w:w), (Sigma-Aldrich, USA), and OD of each well was measured at 595 nm by using Elisa reader (BioTek Elisa reader, µQuant, Switzerland). Eight replicates were used for each analysis. The cut-off OD (OD_c) values of biofilm quantities for the microtiter plate assay were calculated with the following formula: average OD of negative control (medium only) + 3x standard deviation (SD) of negative control. The isolates were categorized as follows: OD ≤ ODc; non-producer, ODc<OD ≤ 2 × ODc; weak, 2×ODc <OD ≤ 4 × ODc; moderate, 4 × ODc < OD; strong **(Saxena *et al*., 2014)**.

Determination of biofilm formation on stainless steel surface

The number of biofilm cells were enumerated by using the bead vortexing method described previously with a few modifications **(Giaouris and Nychas, 2006)**. Rectangle stainless steel (grade 316 L, in 2.5 x 0.8 x 0.1 cm in dimensions) coupons were used as abiotic substratum in this study. The coupons were treated with isopropanol (Sigma-Aldrich, USA) over night and agitated with 10% sodium dodecyl sulphate (SDS), (Merck, Germany) for 30 min before rinsing with deionized water. The previously autoclaved sterile coupons were placed aseptically into 3.5 mL of TSB containing tubes before inoculation with 1 mL of the enriched bacterial culture. The tubes were incubated at 37°C, 45°C or 55-65°C depending on the isolates during 48 h. At the end of incubation period, the coupons were removed and rinsed with SP for the removal of the planktonic cells. After washing, one of the coupons was taken into a new tube containing 4.5 mL of SP and the attached biofilm cells were mechanically agitated by scraping with loops. The second coupon was directly placed into a different tube containing sterile 3.5 mL of SP including glass beads (diameter 3 mm) and, then agitated by vortexing for 2 min (IKA, Germany), at maximum speed **(Parkar *et al*., 2001; Giaouris and Nychas, 2006)**.

Colony forming unit was enumerated by drop plate method to evaluate the attached viable biofilm cells on these coupons **(Herigstad *et al*., 2001)**. 100 µL of the agitated suspension was used to prepare serial dilutions in sterile 900 µL of SP for each sample. Bacterial counts were done on MI agar plates after incubation for 24 h at appropriate temperatures. Only coupon and sterile TSB containing test tubes were used as negative controls. The results were calculated as colony forming units per unit area (CFU/cm^2) and then converted to logarithmic base ($logCFU/cm^2$). The data obtained from mechanical agitating methods of scraping and bead vortexing were used to assess the best method for the removal of attached cells from the surface. For each coupon, all experiments were performed in duplicate.

Determination of optimum growth and biofilm formation conditions

The optimal conditions for bacterial growth were evaluated by spectrophotometrically measuring the OD600 nm at the incubation times of 0, 6, 18, 24, and 48 h for various temperatures, pH values, and salinities in 96-well microtiter plates containing TSB medium. The temperature for optimal growth was determined by incubating the strains at temperatures ranging from 30 to 65°C. The effect of pH and salinity was checked in TSB media which have various pH values ranging from 4.0 to 11.0, or were supplemented with different NaCl concentrations (0 to 5%). After 48 h incubation, crystal violet binding assay was carried out as described previously for the determination of biofilm production in these environmental parameters.

Extraction and quantification of protein, carbohydrate, and eDNA (extracellular DNA) of EPSs

The isolates were grown at their optimal biofilm producing conditions on TSA plates for 18 h and 0.5 g of the bacterial biomass were collected from the plates before partial purification of their EPSs. The biomass were suspended and subjected to agitation procedure in 2 mL of SP and centrifuged at 13.000 rpm for 7 min. After centrifugation, the removed supernatant was filtered through a 0.22 µm membrane filter (Sartorious, France) and used for the quantitative measurement of protein, carbohydrate, and eDNA contents.

For the quantification of carbohydrate content, phenol-sulphuric acid method was applied **(Dubois *et al*., 1956)**. Calibration curve was determined by using glucose standard. One mL of the filtered supernatant was mixed with 0.5 mL of phenol (Sigma-Aldrich, USA) and 5 mL of concentrated sulphuric acid (Merck, Germany) in this assay. The results were measured spectrophotometrically at 490 nm. Protein concentration of EPSs was also measured at 660 nm based on the method described by Lowry **(Lowry *et al*., 1951)**, and 0.1 to 10 mg/mL concentrations of BSA (Sigma-Aldrich, USA) were used as protein standard.

Genomic DNA was extracted from the bacterial pellet by using genomic DNA purification kit (Fermentas K0512, USA). Approximately a 500 µL portion of the filtered supernatant was also used for eDNA purification procedure using phenol/chlororoform/isoamylalcohol method which was slightly modified **(Wilson, 2001)**. After precipitation with 70% ethanol (Sigma-Aldrich, USA), the eDNA was air-dried and then dissolved in 30 µL of TE buffer (Tris-EDTA,

pH 8.0). Both the purity and quantity of genomic and eDNA were checked by evaluating the absorbance values at 260 and 280 nm wavelengths by nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, USA). DNA samples were also visualized after subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis at 120 V for 1 h.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed to all the data using SPSS 17.0 software (IBM, USA) by performing one-way ANOVA, Tukey's and Dunnett's tests. Probability levels of <0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Pellicle formation of the isolates

According to the findings, biofilm formation and EPSs characteristics of the E114, D75b, B93, and D621 isolates were summarized in Table 1. In the case of pellicle formation, bacterial cultures were visualized during 96 h growth in TSB for assessing their ability of forming a ring like structure at the liquid-air interface. All the isolates initially produced a ring structure at the interface by attaching to the glass surface after 6 h of growth at applied temperatures. The pellicles increased gradually by the accumulation of EPSs from 24 to 96 h and, the floating pellicle at the air-liquid interface completely covered the surface of the broth cultures (Fig 1a). Despite rigidly shaking, the pellicles of E114, D75b, and B93 could not be dispersed. By contrast, thermophilic D621 isolate was able to form a fragile pellicle both at 55°C and 65°C that could easily be dispersed by slightly shaking.

Determination of complex exopolysaccharides in EPSs and bacterial motility assay

E114, D75b, and B93 isolates, having rigid pellicles could become fluorescently visible on TSA plates without NaCl, supplemented with calcofluor that binds to complex exopolysaccharides such as cellulose or its derivate in the EPSs matrix (Fig 1b). On the other hand, the exopolysaccharides, produced by D621 isolate forming fragile pellicles, could able to bind to calcofluor by generating lesser bright fluorescence under UV-light. In addition, E114, B93, D621, and D75 cells were all found to be motile both on solid and on air-liquid surfaces. While E114, B93, and D621 were found to harbour peritrichous flagella, the D75 isolate was observed to have lophotrichous flagellum (Fig 1c).

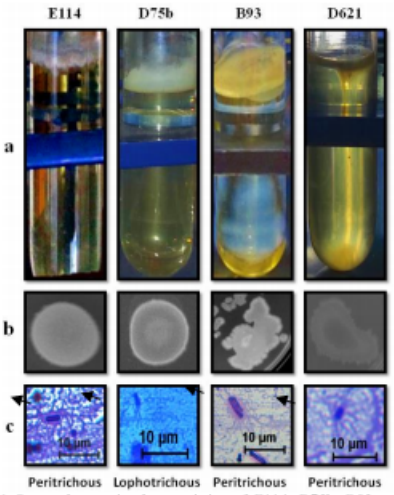


Figure 1 Some phenotypic characteristics of E114, D75b, B93, and D621. Isolates were incubated at different temperature values at 37°C (E114), 45°C (D75b, B93) and 55-65°C (D621) according to the bacterial growth conditions (a). Pellicle formation in the liquid-air interface during 96 h of growth under static conditions (b). Fluorescence of the colonies under UV light growth on calcofluor supplemented plates after 24 h incubation, and (c) Light microscope micrograph showing the flagella staining of the 4 h-old cultures (Arrows indicate the flagella positions).

Colony morphotypes of the isolates on Congo Red Agar (CR)

The changes in the colony morphologies of E114, D75b, B93, and D621 isolates on CR plates at the days 2 and 4 (left), and their related stereo micrographs (right) were given in Fig. 2. E114, D75b, and B93 isolates had opaque and non-pigmented cream coloured colonies, while thermophilic D621 had pale yellow colour and transparent colonies when incubated on TSA plates supplemented with CR. On the other hand, *B. licheniformis* E114 displayed a circular, raised, a mucoid colony morhotype with undulate edges, rough and dull surface, having red colour at the end of 96 h-incubation period on CR plates. Although the entire colony colour was turned into red, the ring like structure in the middle, containing bundles had a darker red colour. In the case of *B. thermoruber* B93, its colonies were circular, mucoid, and raised, having orange coloured, undulate edges and smooth surface with nested ring formations which contained bundles in the middle. The increase in the colony diameters were measured as 0.9 cm. The diameters of these nested ring formations, which turned into dark orange in the centre, were increased gradually during the incubation period. The circular, flat, smooth, dull, non-mucoid and red colonies of *B. pumilus* D75b isolate had lobate margins at the end of 96 h-incubation period. The size of the colonies was measured with a 0.4 cm increase. There was a darker red ring having bundle formation only in edges in contrast to E114 and B93 isolates which had bundles in the centre of the colonies. Finally, the general colony morphotype was quite different in *A. caldiproteolyticus* D621, when compared with its mesophilic and facultative thermophilic counterparts. The orange colonies that are darker in their edges were punctiform, flat, non-mucoid, rough and shiny with lobately margins. Also a ring formation was observed in the dark orange coloured lobate margins. The change in its colony diameters was measured as 0.45 cm.

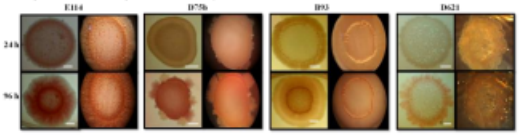


Figure 2 Dye binding properties and colony morhotypes of E114, D75b, B93 and D621 isolates on TSB without NaCl plate containing Congo Red and 3% agar during 4 days of incubation. On the left sides of the figures, general colony view and their right sides, the stereo microscope micrographs with a magnification of 0.63 x were presented. Bar indicates 5 mm.

Microtiter plate assay

E114, D75b, B93, and D621 isolates were found to be strong biofilm producers according to the cut off values after 48 h incubation. The crystal violet binding assay displayed that *B. licheniformis* E114 produces a great amount of biomass with an $OD_{595\ nm}$ value of 3.661 (SD ± 0.290) at the end of 96 h-growth in TSB (without NaCl at 37°C, pH 7.3). The amount of biofilms for D75b, and B93 isolates were measured as 3.319 (SD ± 0.359) and 2.379 (SD ± 0.337) at 45°C respectively. The thermophilic D621 isolate was also found to produce strong biofilms at 55°C ($OD_{595\ nm}$: 0.293, SD ± 0.105) and 65°C ($OD_{595\ nm}$: 0.475, SD ± 0.073).

Biofilm formation of the isolates on stainless steel surface

Stainless steel was used in order to determine the adherence capacities of the isolates. *B. licheniformis* E114, *B. pumilus* D75b and *B. thermoruber* B93 could easily attached to the surface of the coupons during a 48-h incubation period. In contrast to these findings, the viable cell numbers of *A. caldiproteolyticus* D621 on stainless steel were low as in the case of its lower biomass formation on polystyrene plates. Of those mechanical agitating methods, bead vortexing was found to be superior to scraping for D75b, B93 and D621 (logCFU/cm^2 values for vortexing: 4.44, 4.88, 1.85; scraping: 4.28, 4.61, 1.75, respectively), when they were applied to remove the attached cells from the surface of the stainless steel. By contrary, the viable cell enumerations of *B. licheniformis* E114 was found to be 5.79 logCFU/cm^2 by scraping, whereas it was found as 5.7 logCFU/cm^2 in bead vortexing. The logCFU/cm^2 values between scraping and bead vortexing assays were found to be statistically different ($p < 0.05$; Tukey's test). Therefore, from now on according to these comparative cell removal studies, bead vortexing was preferred for dispersion of D75b, B93 and D621 isolates, while for removal of E114 cells scraping was employed.

Optimal growth and biofilm formation conditions of the isolates

B. licheniformis E114 was found to grow and form biofilms in a wide range of pH values (pH 5.0 to 11.0), salinities (0 to 5.0%) and temperatures (30-45°C), whereas the isolate could only form stronger biofilms at higher pH (8.0) and salinity (4.0%) values compared to its optimal growth (pH 6.5, 1.5% NaCl) parameters. In the case of *B. pumilus* D75b, the isolate was able to grow and form biofilms between pH 7.0 and 10.0. A more alkaline pH (pH 8.5) was required for optimal biofilm formation of D75b when compared with its optimal growth at pH 6.0. However, both the salinity (at 0% NaCl) and temperature (at 45°C) requirements for its biofilm formation were found to be lower than in its optimal growth conditions. Though the isolate was halotolerant and facultative thermophilic, its biofilm generation was restricted by the increased salinity and temperature values. In the case of *B. thermoruber* B93, the isolate was able to grow between wide pH values ranging from 6.0 to 11.0 and said to be halotolerant (0-5.0%), but it could produce stronger biofilms between pH 6.0 to 9.5 only in the absence of NaCl at 50°C. Therefore, NaCl and pH changes were found to be restrictive parameters on biofilm generation of B93. Thermophilic *A. caldiproteolyticus* D621 isolate could grow at pH 6.0 to 8.0, at temperatures in between 50°C and 65°C, but was not able to grow and form biofilm in the presence of NaCl. Its optimal biofilm formation was observed at a lower pH value (at pH 6.0), but at a higher temperature (at 55°C), when compared with its optimal growth conditions (pH 8.0, 50°C). Therefore, low pH and high temperature and absolutely the absence of NaCl increased the biofilm formation of D621 isolate. Dunnett's test was performed for the evaluation of optimal environmental conditions for biofilm forming and growth and biofilm formation capacities of all isolates could able to be increased by optimizing processes (Dunnett's test $p < 0.05$), (Fig. 3).

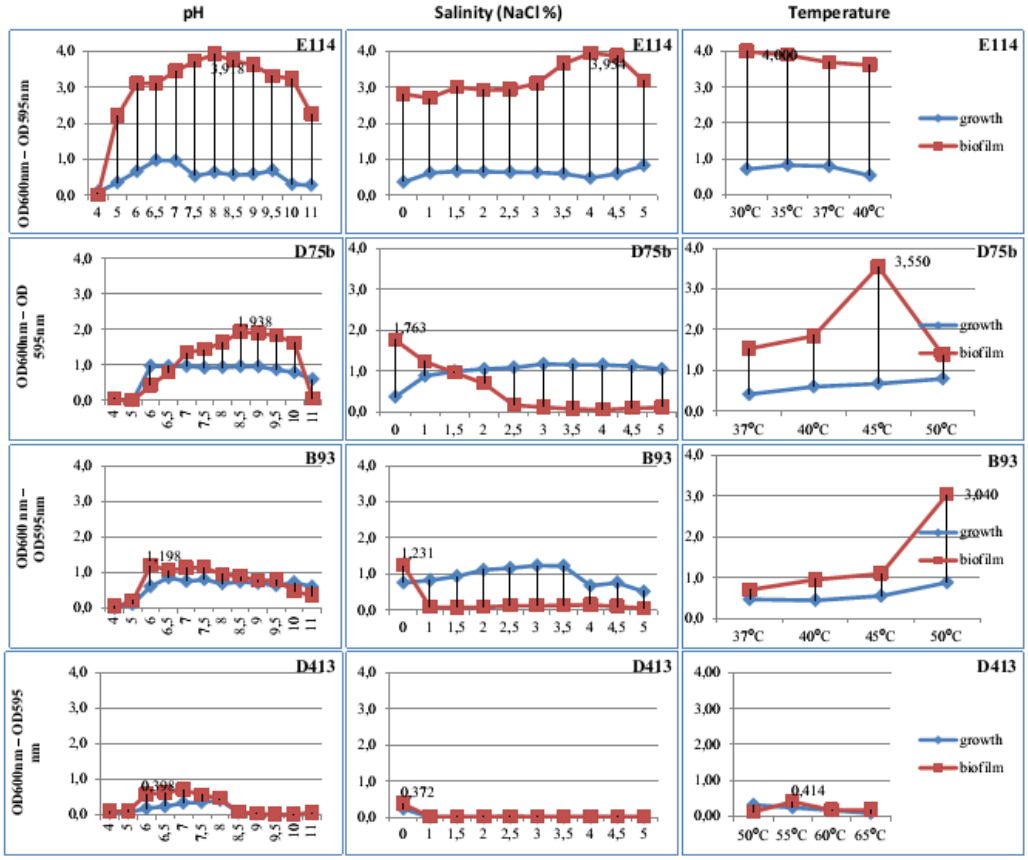


Figure 3 The influence of pH, salinity and temperature on the amount of biofilm (OD_{595nm}) and also on the bacterial growth (OD_{600nm}) for E114, D75b, B93 and D621 isolates after 48 h growth.

Effects of optimal conditions on biofilms formed on polystyrene and stainless steel surfaces

When the biofilm production on stainless steel and polystyrene surfaces were compared before and after optimization studies, an increase in the production of biofilm was achieved for all of the isolates (Fig. 4). At their individual optimal conditions, the amount of the biomass on polystyrene surfaces were increased up to 41%, 28%, 9%, and 7% for D621, B93, E114 and D75b, isolates after 48 h incubation, respectively. Moreover, 35%, 13%, 9%, and 2% increase could be achieved in the viable cell numbers of D621, D75b, B93, and E114 isolates on the surface of the stainless steel respectively. The most surprising data were obtained from the mesophilic *B. licheniformis* E114 and thermophilic *A. caldiproteolyticus* D621 isolates. At optimal conditions, *B. licheniformis* E114 was found to be the superior in regards to the biomass formed on polystyrene surface, whereas the lowest increments in the cell numbers was also counted for this isolate, although it reached to the highest (5.91 logCFU/cm^2) cell numbers on the stainless steel coupon compared to the other three bacilli. Surprisingly, thermophilic D621 isolate was the one which produced the lowest biomass and viable cell numbers (2.49 logCFU/cm^2) for both of the abiotic surfaces used, but

the highest increments in cell counting assays on stainless steel were achieved on D621 isolate after applying optimal conditions.

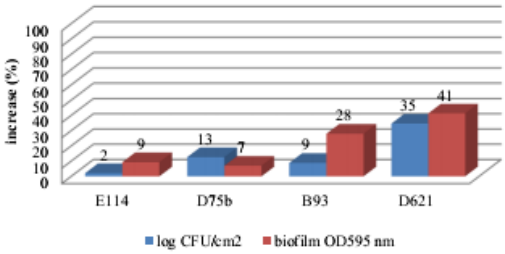


Figure 4 The amount of viable cell numbers and biomass before and after optimization of biofilm formation assays (In the viable cell enumerations, the agitating methods of bead vortexing results were compared for D75b, B93, and D621 isolates, whereas data after scraping was used for E114).

Quantification of protein, carbohydrate and eDNA contents of EPSs

General EPSs contents of E114, D765b, B93 and D621 isolates were presented in Table 1. Among the isolates, the highest carbohydrate content was measured as 82 µg/mL in *B. thermoruber* B93. The protein contents of E114, D75b, B93 and D621 were quantified as 831, 1103, 2343, and 3235 µg/mL (at 30°C, 45°C, 50°C, 55°C), respectively. There was a correlation between the thermostability and the protein content of EPSs matrix. The protein content in *A. caldiproteolyticus* D621 was nearly 4-fold higher, when compared with its mesophilic *B. licheniformis* E114 counterpart. The molecular weights of eDNA and genomic DNA in the biofilm differed from each other. A 22.1, 22.6, 22.2 and 23.5 kb genomic DNA were observed for the biofilm associated sessile cells of E114, D75b, B93 and D621 isolates respectively, which differed from their related eDNA contents having smaller molecular weights (20.1, 17.7, 18.4 and 21.4 kb, respectively), (Fig. 5). The amount of eDNA contents E114 and D621 isolates were found to be quite high.

Table 1 General biofilm and EPSs characteristics of E114, D765b, B93 and D621 isolates.

Parameters			*B. licheniformis* E114	*B. pumilus* D75b	*B. thermoruber* B93	*A. caldiproteolyticus* D621
Optimal conditions for	pH	Growth	6.5	8.5	6.5	8.0
		Biofilm	8.0	8.5	6.0	6.0
	NaCl	Growth	1.5%	3.0%	3.0-3.5%	0.0%
		Biofilm	4.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Temperature	Growth	35°C	50°C	50°C	50°C
		Biofilm	30°C	45°C	50°C	55°C
EPSs content	Protein (µg/mL)		831	1103	2343	3235
	Carbohydrate (µg/mL)		38	42	82	32
	eDNA (ng/µL) - MW (kb)		2255 – 20.1	826 – 17.7	1150 – 18.4	2565 -21.4
Biofilms on polystyrene plates at optimal conditions (OD_{595} nm)			≤4,000	3,550	3,040	0,414
Viable cell numbers on stainless steel at optimal conditions (logCFU/cm^2)			5,91	5,00	5,31	2,49
Colour formation by interactions between amyloid fibres of EPSs matrix and CR			+ (red)	+ (red)	+ (orange)	+ (orange)
Change in the colony diameter in CR during 96 h			1.15 cm	0.4 cm	0.9 cm	0.45 cm
Presence of fluorescence by binding of β(1-3) /β(1-4) linkages of EPSs polysaccharides to calcofluor			+	+	+	⊥
Pellicle type			Rigid	Rigid	Rigid	Fragile

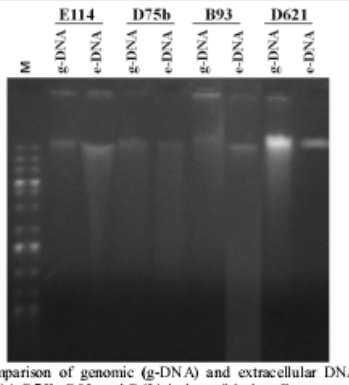


Figure 5 Comparison of genomic (g-DNA) and extracellular DNA (e-DNA) contents of E114, D75b, B93, and D621 isolates (Marker: Fermentas Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder, 75-20000 bp).

DISCUSSION

The biofilm characteristics and EPSs components of many endospore-forming bacilli are still unclear and their EPSs properties seem to offer numerous applications in different fields of industry **(Guezennec, 2002)**. The importance of some *Bacillaceae* family members is already known as they are able to produce high levels of EPSs. Of those bacilli, it is revealed that facultative thermophilic *Brevibacillus* species can be used as a factory for the expression of many biotechnologically important enzymes and heterologous proteins including cytokines, antigens, and adjuvants **(Mizukami *et al*., 2010; Panda *et al*., 2014)** and can be exploited as an excellent tool for structural and functional biology. Although *Brevibacillus* EPSs has high exopolysaccharide or protein content, and there is also a strong relationship between biofilm and EPSs production, there is no information about the biofilm generation for this biomaterial factory **(Radchenkova *et al*., 2011; Yasar Yildiz *et al*., 2013)**.

In recent years, *B. licheniformis* has also become a model microorganism as in the case of *Bacillus subtilis* for the study of its biofilm formation and EPSs matrix. There are *B. licheniformis* isolates that are known to produce EPSs containing trisaccharide units **(Spanò *et al*., 2013)**, exopolymer levan which was used in oil recovery **(Ghaly *et al*., 2007)** or extracellular proteins having anti-biofilm activity **(Sayem *et al*., 2011; Dusane *et al*., 2013)**. In addition, as *B. licheniformis* is a major contaminant of dairy products besides *B. subtilis*, *Geobacillus stearothermophilius* and *Anaerybacillus flavithermus* species, their biofilms were also studied as they could easily attach and form biofilms on stainless steel surfaces that were used in industrial applications **(Parkar *et al*., 2001; Yuan *et al*., 2012; Lücking *et al*., 2013)**.

In the case of facultative thermophilic *Bacillus pumilus*, it is found in milk as a contaminant and may produce toxins that lead to food poisoning **(Lücking *et al*., 2013)**. There are solely a few investigations on the general biofilm formation capabilities of some *B. pumilus* isolates on glass or stainless steel surfaces **(Parkar *et al*., 2001; Dusane *et al*., 2010)**. Except the other three bacilli used in this study, the biofilm formation and EPSs characteristics of thermophilic *A. caldiproteolyticus* was firstly reported in this area.

In all the bacterial isolates, a ring formation characterized by attaching to the glass surface after 6 h of growth was observed, with a subsequent gradually increasing volume of pellicle at the air-liquid interface. It is known that strains having rigid pellicle mostly fluoresced strongly under UV light on calcoflour agar plates, whereas the ones forming fragile pellicle fluoresced with lower intensity as in the case of thermophilic D621 isolate having fragile pellicle **(Solano *et al*., 2002)**. From other researches dealing with the endospore-forming bacilli, regarding *Bacillus subtilis* 1A700 biofilms, a ring like structure, which

mostly harbours the sporulated cells, was observed when it was grown on MOPS-based agar **(Veening *et al.*, 2006)**.

The previous findings on *Bacillus subtilis* CR morphotypes revealed that CR was found to be binding to TasA protein, and turning into red in wild type strains **(Romero *et al.*, 2010)**. Moreover, when a strain is unable to produce extracellular matrix, the colony morphotype was found to be completely flat **(Aguilar *et al.*, 2007)**. Therefore, TasA is defined as a kind of amyloid curli fibers as found in the pathogenic species from *Enterobactericeace* like *E. coli* and *S. enterica* serotype Typhimurium, and also used to understand the presence of amyloid fibers in the EPSs matrix component of a few *Bacillaceae* members **(Romero *et al.*, 2010; Milanov *et al.*, 2015b)**. In the case of *Enterobactericeace* family, different matrix components were expressed on CR plates according to the EPSs and biofilm production capabilities of the bacteria, and this was used to compare general colony phenotypes. Only thin, aggregative fibers called curli fimbriae are produced, in "bdar" phenotype generating brown, dry and rough colonies. In addition, only cellulose is produced in EPSs, in "pdar" morphotype give rise to the colonies appearing pink, dry and rough. But when bacteria is able to produce both the curli fimbriae and cellulose in its EPSs matrix, then colonies having dark red colour, dry and rough (rdar) surface are formed. If there is no expression of matrix components, then smooth and white colony phenotype called saw morhotype grows on plates supplemented with Congo red dye **(Solano *et al.*, 2002; Milanov *et al.*, 2015b)**.

According to the morphotype explanations above, the most invasive isolate on solid agar plates was *B. licheniformis* E114. Besides, although the colony colours of both mesophilic E114 and facultative thermophilic D75b were red, orange colour was observed in facultative thermophilic B93 and thermophilic D621 isolates. Both E114 and B93 isolates had darker coloured rings containing bundles in the centre of the colony, whereas bundles were located in the colony edges of D75b and D621. Thus, in all isolates the change of general colony colours into red and orange indicates the presence of cellulose-like carbohydrates in the EPSs matrixes. In addition, the area with darker colours in the rings could contain amyloid curli fibres that can bind to CR.

It was also revealed that especially E114, D75b and B93 isolates were able to form strong biofilms not only on polystyrene plates, but also on stainless steel surfaces as well as at the air-liquid interfaces. The mesophilic *B. licheniformis* E114 was found to be superior when compared with the other isolates in terms of the viable cell enumerations on stainless steel and also the amount of biomass on polystyrene wells. On the other hand, the least biofilm formation on polystyrene and cell attachment on steel surface was observed in the thermophilic isolate D621.

It was revealed that both *B. pumilus* D75b and *B. licheniformis* E114 isolates require alkaline pH and decreased temperature values for triggering their biofilm formation whereas, they differ in their salinity requirements. In the case of *B. thermoruber* B93 and *A. caldiproteolyticus* D621 isolates, they require lower pH and salinity values, but higher temperatures for biofilm formation. In addition, the optimal temperature for biofilm generation was higher than for its optimal growth condition for thermophilic D621 and increased temperatures positively influenced its biofilm generation, when compared with the others. Therefore, it could be concluded that both the pH and salinity requirements for biofilm formation are not directly proportional with the optimal growth conditions of these bacilli, but there is a direct correlation between biofilm formation and temperature requirement in both mesophilic and thermophilic isolates. While increased temperature values sharply decreased the biofilm formation of mesophilic ones, in the case of thermopiles, it induced the biofilm generation, thus the biomass.

When the optimal conditions were applied in order to produce biofilms on polystyrene surfaces and stainless steel for each isolate, especially increased production of biomass on surfaces of the polystyrene wells were achieved for all the isolates. At optimal conditions, *B. licheniformis* E114 was found to be the superior in terms of its adherence capability both on polystyrene and steel surfaces, whereas the least biofilm former on these substratum was the thermophilic D621 isolate (Fig. 4). The surface preference changed according to the isolate. On stainless steel, viable cell number enumerations were found in E114, B93, D75b and D621 isolates from highest to the lowest respectively. In the case of polystyrene surfaces, biomass production was achieved in the decreasing order from E114, D75b, B93 to D621 isolates.

According to the EPSs characterization studies carried out at the optimal conditions, the protein concentration of the purified EPSs of the isolates were all found to be very high, when compared with the other carbohydrate and nucleic acid components. The highest protein content was found in the thermophilic *A. caldiproteolyticus* D621 in contrast to its mesophilic *B. licheniformis* E114 counterpart (Table 1). Therefore, a direct proportion was revealed between the thermostability and protein content of EPSs. Also the amount of eDNA content was the highest in thermophilic D621 isolate. It was obvious that especially as the EPSs contents of the isolates were mostly found to be composed of eDNA and proteins, they were probably very important in the rigidity and especially thermostability of their biofilms.

As *Brevibacillus* species are known to be good EPSs producers, they can be used in many applications in biotechnology. In the studies carried out with *B. thermoruber* T1E **(Bihari *et al.*, 2010)** the EPSs product was obtained when bacteria was grown at 50°C, pH 7.0 under aerobic conditions. It is known that *B. thermoruber* 438 was able to grow well in a wide pH range (6.0-8.0), while the maximum EPSs production was achieved at 50°C, pH 8.0 **(Radchenkova *et al.*, 2011)**. In addition, the maximum EPSs production of *B. thermoruber* 423 was accomplished when bacterium was grown at 55°C, pH 6.5 **(Yasar Yildiz *et al.*, 2013)**. Moreover, both *B. thermoruber* 438 and 423 are able to produce high amount of EPSs mostly composed of exopolysaccharides **(Radchenkova *et al.*, 2011; Yasar Yildiz *et al.*, 2013)**. The EPSs content of *B. thermoruber* T1E mostly consists of proteins including products of small oligopeptides, keratinase and proteases **(Bihari *et al.*, 2010)**. *B. thermoruber* B93 generally resembles the strain T1E regarding with its high protein content. Different from those studies, B93 isolate had broader pH stability (6.0 to 9.5) in biofilm production and might be more useful in harsh industrial processes considering its EPSs production in addition to its thermostability, non-pathogenicity and fast productivity.

Despite its low biomass production, *A. caldiproteolyticus* D621 isolate was found to be the one harbouring the highest protein content in its EPSs matrix. There is also no any other literature, dealing with the biofilm or EPSs of this thermophilic bacilli. The EPSs production of D621 isolate with high protein content at relatively high temperatures (up to 65°C), and its non-pathogenicity would also be an advantage in many industrial processes.

In the researches dealing with *B. licheniformis* EPSs, the ones harbouring trisaccharide units, exopolymer levan or some extracellular proteins with anti-biofilm activity were detected **(Sayem *et al.*, 2011; Dusane *et al.*, 2013; Spanò *et al.*, 2013)**. This study revealed that mesophilic *B. licheniformis* E114 isolate can be considered as a strong biofilm manufacturer. It is obvious that this mesophilic isolate was superior on adhering to the surfaces when compared with its facultative thermophilic and thermophilic counterparts. Not only the *B. licheniformis* but also the *B. pumilus* species are known as milk contaminants, and the data obtained in this study revealed their strong attachment capabilities in the biofilm formation processes in comparison with their thermophilic counterparts and might explain their higher abundance especially in diary related products.

CONCLUSIONS

As a conclusion, this is the first comparative report on the basic biofilm characteristics and biofilm formation capabilities of four endospore-formers that exhibit mesophilic or thermophilic growth. As biofilm production is directly associated with the EPSs production of an organism, these four bacilli had some specific features with the advantages of fast productivity and were proved to be very promising model organisms for microbial EPSs production. Therefore, the data of biofilm formation and EPSs production capabilities of these isolates would be a base for the identification and characterization of their EPSs in further studies.

Acknowledgements: Financial support for this study was through Scientific Research Project Office of Ankara University (14H0430007).

REFERENCES

Aguilar, C., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2007). Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Current opinion in microbiology*, *10*(6), 638-643. http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.006

Arena, A., Gugliandolo, C., Stassi, G., Pavone, B., Iannello, D., Bisignano, G., & Maugeri, T. L. (2009). An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: antiviral activity on immunocompetent cells. *Immunology letters*, *123*(2), 132-137. http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.03.001

Ben-Jacob, E., Cohen, I., & Gutnick, D. L. (1998). Cooperative organization of bacterial colonies: from genotype to morphotype. *Annual Reviews in Microbiology*, *52*(1), 779-806. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.779

Bihari, Z., Videki, D., Mihalik, E., Szvetnik, A., Szabo, Z., Balázs, M., & Kiss, I. (2010). Degradation of native feathers by a novel keratinase-producing, thermophilic isolate, *Brevibacillus thermoruber* T1E. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *65*(1-2), 134-140.https://doi.org/10.1515/znc-2010-1-221

Burgess, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M., & Flint, S. H. (2009). The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of applied microbiology*, *107*(3), 1012-1018.https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04282.x

Cihan, A. C., Ozcan, B., Tekin, N., & Cokmus, C. (2011). Phylogenetic diversity of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolated from different geothermal regions of Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(11), 2683-2696.https://doi.org/10.1007/s11274-011-0742-2

Cihan, A. C., Tekin, N., Ozcan, B., & Cokmus, C. (2012). The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ardra analyses isolated from geothermal regions of turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(1), 309-324.https://doi.org/10.1590/s1517-83822012000100037

Coleri, A., Cokmus, C., Ozcan, B., Akkoc, N., & Akcelik, M. (2009). Isolations of α-glucosidase-producing thermophilic bacilli from hot springs of Turkey. *Microbiology*, *78*(1), 56-66. https://doi.org/10.1134/s0026261709010081
Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., & Heyndrickx, M. (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology*, *31*(2), 126-140.https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.03.002
Dai, J., Liu, Y., Lei, Y., Gao, Y., Han, F., Xiao, Y., & Peng, H. (2011). A new subspecies of *Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanensis* ssp. nov. with very high ethanol tolerance. *FEMS Microbiology Letters*, *320*(1), 72-78.https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02294.x
Doroshenko, E. V., Loiko, N. G., Il'inskaya, O. N., Kolpakov, A. I., Gornova, I. B., & Klimanova, E. V. (2001). Characterization of *Bacillus cereus* Dissociants. *Microbiology*, *70*(6), 698-705.https://doi.org/10.1023/a:1013191916648
Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, *28*(3), 350-356.https://doi.org/10.1021/ac60111a017
Dusane, D. H., Nancharaiah, Y. V., Zinjarde, S. S., & Venugopalan, V. P. (2010). Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *81*(1), 242-248.https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.013
Dusane, D. H., Damare, S. R., Nancharaiah, Y. V., Ramaiah, N., Venugopalan, V. P., Kumar, A. R., & Zinjarde, S. S. (2013). Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *Bacillus licheniformis*. *PloS One*, *8*(5), e64501.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064501
Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., & Crawford, R. (2001). The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, *90*(2), 151-157.https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01215.x
Ghaly, A. E., Arab, F., Mahmoud, N. S., & Higgins, J. (2007). Production of levan by *Bacillus licheniformis* for use as a soil sealant in earthen manure storage structures. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, *3*(8).https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2007.47.54
Giaouris, E. D., & Nychas, G. J. E. (2006). The adherence of *Salmonella Enteritidis* PT4 to stainless steel: The importance of the air–liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*, *23*(8), 747-752.https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.02.006
Guezennec, J. (2002). Deep-sea hydrothermal vents: a new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest?. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *29*(4), 204-208.https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000298
Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, *44*(2), 121-129.https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00241-4
Kambourova, M., Mandeva, R., Dimova, D., Poli, A., Nicolaus, B., & Tommonaro, G. (2009). Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. *Carbohydrate Polymers*, *77*(2), 338-343.https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.004
Kobayashi, K. (2007). Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *66*(2), 395-409.https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05923.x
Koc, M., Cokmus, C., & Cihan, A. C. (2015). The genotypic diversity and lipase production of some thermophilic bacilli from different genera. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*(4), 1065-1076.https://doi.org/10.1590/s1517-838246420140942
Lazarevic, V., Soldo, B., Médico, N., Pooley, H., Bron, S., & Karamata, D. (2005). *Bacillus subtilis* α-phosphoglucomutase is required for normal cell morphology and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(1), 39-45.https://doi.org/10.1128/aem.71.1.39-45.2005
Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265-275.
Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., & Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, *166*(2), 270-279.https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004
Milanov, D. S., Prunić, B. Z., Velhner, M. J., Pajić, M. L., & Čabarkapa, I. S. (2015a). RDAR morphotype: A resting stage of some *Enterobacteriaceae*. *Food and Feed Research*, *42*(1), 43-50.https://doi.org/10.5937/ffr1501043m
Milanov, D., Prunić, B., Velhner, M., Todorović, D., & Polaček, V. (2015b). Investigation of biofilm formation and phylogenetic typing of *Escherichia coli* strains isolated from milk of cows with mastitis/Ispitivanje formiranja biofilma i filogenetska tipizacija sojeva *Escherichia coli* izolovanih iz mleka krava sa mastitisom. *Acta Veterinaria*, *65*(2), 202-216.https://doi.org/10.1515/acve-2015-0017
Mizukami, M., Hanagata, H., & Miyauchi, A. (2010). *Brevibacillus* expression system: host-vector system for efficient production of secretory proteins. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *11*(3), 251-258.https://doi.org/10.2174/138920110791112031
Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltaraus, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., & Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, G. th. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51*(2), 433-446.https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-433
Palmer, J. S., Flint, S. H., Schmid, J., & Brooks, J. D. (2010). The role of surface charge and hydrophobicity in the attachment of *Anoxybacillus flavithermus* isolated from milk powder. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *37*(11), 1111-1119.https://doi.org/10.1007/s10295-010-0758-x
Panda, A. K., Bisht, S. S., DeMondal, S., Kumar, N. S., Gurusubramanian, G., & Panigrahi, A. K. (2014). *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie van Leeuwenhoek*, *105*(4), 623-639.https://doi.org/10.1007/s10482-013-0099-7
Parkar, S. G., Flint, S. H., Palmer, J. S., & Brooks, J. D. (2001). Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, *90*(6), 901-908.https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01323.x
Radchenkova, N., Tomova, A., & Kambourova, M. (2011). Biosynthesis of an exopolysaccharide produced by *Brevibacillus thermoruber* 438. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *25*(sup1), 77-79.https://doi.org/10.5504/bbeq.2011.0115
Radchenkova, N., Vassilev, S., Panchev, I., Anzelmo, G., Tomova, I., Nicolaus, B.,& Kambourova, M. (2013). Production and properties of two novel exopolysaccharides synthesized by a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *171*(1), 31-43.https://doi.org/10.1007/s12010-013-0348-2
Romero, D., Aguilar, C., Losick, R., & Kolter, R. (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(5), 2230-2234.https://doi.org/10.1073/pnas.0910560107
Römling, U., & Rohde, M. (1999). Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. *FEMS Microbiology Letters*, *180*(1), 91-102.https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08782.x
Ronimus, R. S., Parker, L. E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., & Morgan, H. W. (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, *85*(1), 45-61.https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.020
Saxena, S., Banerjee, G., Garg, R., & Singh, M. (2014). Comparative study of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients of lower respiratory tract infection. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *8*, DC09-DC11.https://doi.org/10.7860/jcdr/2014/7808.4330
Sayem, S. A., Manzo, E., Ciavatta, L., Tramice, A., Cordone, A., Zanfardino, A., & Varcamonti, M. (2011). Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*, *10*(1), 1.https://doi.org/10.1201/b16593-6
Schekleman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P., & Heyndrickx, M. (2005). Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(3), 1480-1494.https://doi.org/10.1128/aem.71.3.1480-1494.2005
Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C., & Lasa, I. (2002). Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular microbiology*, *43*(3), 793-808.https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02802.x
Spanò, A., Gugliandolo, C., Lentini, V., Maugeri, T. L., Anzelmo, G., Poli, A., & Nicolaus, B. (2013). A novel EPS-producing strain of Bacillus licheniformis isolated from a shallow vent off Panarea Island (Italy). *Current Microbiology*, *67*(1), 21-29. https://doi.org/10.1007/s00284-013-0327-4
Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, *40*(2), 175-179.https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6
Suzuki, Y. M., Kishigami, T., Abe, S. (1976). Production of extracellular α-glucosidase by a thermophilic *Bacillus* species. *Applied Environmental Microbiology*, *31(6)*, 807-812.
Teh, K. H., Flint, S., & Bremer, P. (2015) Raw Milk Quality Influenced by Biofilms and the Effect of Biofilm Growth on Dairy Product Quality, in Biofilms in the Dairy Industry (eds K. H. Teh, S. Flint, J. Brooks and G. Knight), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
https://doi.org/10.1002/9781118876282.ch5
Veening, J. W., Kuipers, O. P., Brul, S., Hellingwerf, K. J., & Kort, R. (2006). Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore

resistance in biofilms of Bacillus subtilis. *Journal of bacteriology*, *188*(8), 3099-3109.https://doi.org/10.1128/jb.188.8.3099-3109.2006

Vert, M., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., & Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, *84*(2), 377-410.https://doi.org/10.1515/ci.2012.34.3.25

Wilson, K. (1987). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2-4.https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56

Yasar Yildiz, S., Anzelmo, G., Ozer, T., Radchenkova, N., Genc, S., Di Donato, P., & Kambourova, M. (2014). *Brevibacillus thermoruber*: a promising microbial cell factory for exopolysaccharide production. *Journal of Applied Microbiology*, *116*(2), 314-324.https://doi.org/10.1111/jam.12362

Yildiz, S. Y., Radchenkova, N., Arga, K. Y., Kambourova, M., & Oner, E. T. (2015). Genomic analysis of *Brevibacillus thermoruber* 423 reveals its biotechnological and industrial potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(5), 2277-2289.https://doi.org/10.1007/s00253-015-6388-5

Yasawong, M., Areekit, S., Pakpitchareon, A., Santiwatanakul, S., & Chansiri, K. (2011). Characterization of thermophilic halotolerant *Aeribacillus pallidus* TD1 from Tao dam hot spring, Thailand. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(8), 5294-5303.http://dx.doi.org/10.3390/ijms12085294

Yuan, D. D., Liu, G. C., Ren, D. Y., Zhang, D., Zhao, L., Kan, C. P., & Zhang, L. B. (2012). A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Control*, *25*(2), 752-757.http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.08.019

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular microbiology*, *39*(6), 1452-1463.http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x