

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEREL EKOSİSTEMLERDEN İZOLE EDİLEN VE ENDÜSTRİYEL ÖNEMİ
OLAN PROTEİNLERİ ÜRETEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU,
TANIMLANMASI VE İLGİLİ PROTEİNLERİN TARANMASI**

Hülya BAL
(Biyoloji Öğretmeni)

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Dilek KAZAN**

İSTANBUL 2005

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEREL EKOSİSTEMLERDEN İZOLE EDİLEN VE ENDÜSTRİYEL ÖNEMİ
OLAN PROTEİNLERİ ÜRETEEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU,
TANIMLANMASI VE İLGİLİ PROTEİNLERİN TARANMASI**

Hülya BAL
(Biyoloji Öğretmeni)
141200620000018

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOLOJİ PROGRAMI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Dilek KAZAN**

İSTANBUL 2005

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince beni yönlendiren ve yetişmemde büyük katkısı olan Hocam Sayın Prof. Dr. Dilek KAZAN'a,

Her türlü desteğini vererek bilgisini paylaşan Sayın Dr. Aziz Akın DENİZCİ' ye

Deneysel çalışmalarımı yaptığım süre boyunca her türlü bilgi desteğiyle araştırmayı yönlendiren Sayın Prof. Dr. Altan ERARSLAN'a

Doktora eğitimimi yaptığım Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne ve tez çalışmasını destekleyen (BSE-073/1311) Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna,

Deneysel çalışmalarımı yaptığım süre boyunca bana her türlü imkanı sağlayan TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'ne,

Çalışmalarım süresince destek veren Sayın Doç. Dr. Celal YARCI' ya, yağ asidi analizlerinin yapılmasına olanak sağlayan Doç.Dr. Fikrettin ŞAHİN' e;

Deneysel çalışmalarına katkıda bulunan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru TOKSOY ÖNER'e,

Laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan ve her konuda ortak olan Dr. Dilek COŞKUNER ÖZTÜRK ve Nesrin KARAHAN' a, bilgilerini benimle paylaşan Dr. Diğdem AKTOPRAKGİL, Gazi TURGUT, Birsen CEVHER ÖZDEN ve Aydan SALMAN DİLGİMEN' e ve Araş. Gör. Ömer Faruk BAYRAK' a,

Beni yetiştiren sevgili aileme ve doktora yaptığım süre boyunca bana her konuda gereken yardım, anlayış ve sabır gösteren çocuklarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Eylül 2005

Hülya BAL

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	I
ABSTRACT	III
YENİLİK BEYANI	V
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİL LİSTESİ	X
TABLO LİSTESİ	XI
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
BÖLÜM II : GENEL BİLGİLER	3
II. 1. MİKROBİYAL PROTEAZLAR	3
BÖLÜM III : TEZ ÇALIŞMALARI	7
III. 1. ARAŞTIRMA ARAÇLARI	7
III. 1.1. Araştırma Olanakları (Cihaz vb)	7
III. 1.2. Kimyasallar	7
III. 1. 3. Mikroorganizma.....	8
III. 1. 4. Besiyerleri.....	8
III. 2. ARAŞTIRMA YÖNTEMİ	18
III. 2. 1. Mikroorganizmaların Enzim Profillerinin Belirlenmesi	18
III. 2. 1. 1. Katı Besiyerinde Enzim Profillerinin Belirlenmesi	18
III. 2. 1. 1.1. Proteaz Üretiminin Belirlenmesi.....	18

III. 2. 1. 1.1. Amilaz Üretiminin Belirlenmesi.....	19
III. 2. 1. 1.1. Lipaz Üretiminin Belirlenmesi.....	19
III. 2. 1. 1.1. Selüloz Üretiminin Belirlenmesi.....	20
III. 2. 1. 2. Sıvı Besiyerinde Enzim Profillerinin Belirlenmesi	20
III. 2. 2. Mikroorganizmaların Karakterizasyonu.....	21
III. 2. 2. 1. Kültürel Özellikler.....	21
III. 2. 2. 2. Mikroskopik Özellikleri.....	21
III. 2. 2. 2. 1. Gram Boyama.....	21
III. 2. 2. 2. 2. Endospor Boyama.....	22
III. 2. 2. 3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikler.....	23
III. 2. 2. 3. 1. Katalaz Testi.....	23
III. 2. 2. 3. 2. Oksidaz Testi.....	23
III. 2. 2. 3. 3. İndol Üretimi.....	23
III. 2. 2. 3. 4. Nitratların Redüksiyonu.....	24
III. 2. 2. 3. 5. V-P Testi.....	24
III. 2. 2. 3. 6. Lizozim Varlığının belirlenmesi.....	24
III. 2. 2. 3. 7. Şeker kullanım testleri.....	25
III. 2. 2. 3. 8. Dihidroksi aseton üretimi.....	25
III. 2. 2. 3. 9. Sitrat Testi.....	25
III. 2. 2. 3. 10. Simmon' un Sitrat Testi.....	25
III. 2. 2. 3. 11. Fenil Alanin deaminasyonunun belirlenmesi.....	26
III. 2. 2. 3. 12. Tirozin testi.....	26
III. 2. 2. 3. 13. DNaz Agar Testi.....	26
III. 2. 2. 3. 14. Üreaz testi.....	27
III. 2. 2. 3. 15. %2, %5, %7, %10 NaCl' de büyüme.....	27
III. 2. 2. 3. 16. Maksimum ve Minimum Sıcaklıklarda Büyüme.....	28
III. 2. 2. 3. 17. NaCl - KCl ' de Büyüme.....	28
III. 2. 2. 3. 18. pH 5.7' de Büyüme.....	28
III. 2. 2. 3. 19. Büyüme için pH Aralığı Testi.....	28
III. 2. 2. 3. 1. Karbonhidrat Kullanım Profillerinin Belirlenmesi – API 50 CH Testleri.....	29
III. 2. 2. 4. Hücresel Yağ Asitleri Analizi.....	32
III. 2. 2. 5. Genotipik Özellikler.....	33
III. 2. 2. 5. 1. Genomik DNA İzolasyonu.....	33
III. 2. 2. 5. 1. 1. Agaroz Jel Hazırlanışı.....	33
III. 2. 2. 5. 2. 16 S rRNA geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması.....	34
III. 2. 2. 5. 3. 16S rRNA Dizisinin Belirlenmesi.....	35
III. 2. 2. 5. 3. 1. Filogenetik Ağacın Oluşturulması.....	35
III. 2. 2. 5. 3. 2. İzolat GMBAE 22'nin Accession Numarası.....	35
III. 2. 3. Alkalen Proteaz Enziminin Üretimi.....	36
III. 2. 3. 1. Alkalen Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması.....	36
III. 2. 3. 2. Alkalen Proteaz Enziminin Karakterizasyonu.....	37
III. 2. 3. 2. 1. Alkalen Proteaz Enziminin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi ve Peptid Kütle Haritası	37
III. 2. 3. 2. 2. Alkalen Proteaz Aktivitesi Ölçümü.....	39
III. 2. 3. 2. 2. 1. Tirozin Standart Grafiğinin	

Hazırlanması.....	40
III. 2. 3. 2. 3. Protein Miktarının Belirlenmesi.....	40
III. 2. 3. 2. 3. 1. Protein Standart Grafiğinin	
Hazırlanması.....	41
III. 2. 3. 2. 4. Alkalen Proteazın Sıcaklık, pH Profilinin ve	
Hammarsten Kazein Varlığında Belirlenmesi	41
III. 2. 3. 2. 5. Sıcaklık ve pH'nın Alkalen Proteaz	
Kararlılığı Üzerine Etkisi.....	42
III. 2. 3. 2. 6. Fenilmetilsulfonilflorür Varlığında Enzim	
Aktivitesi.....	42
BÖLÜM IV. SONUÇLAR.....	43
IV.1. MİKROORGANİZMALARIN ENZİM PROFİLLERİNİN	
BELİRLENMESİ.....	43
IV. 1. 1. Katı Besiyerinde Enzim Profillerinin Belirlenmesi.....	43
IV. 1. 2. Sıvı Besiyerinde Enzim Profillerinin Belirlenmesi.....	47
IV. 2. MİKROORGANİZMALARIN	
KARAKTERİZASYONU.....	51
IV. 2. 1. Kültürel Özellikleri.....	51
IV. 2. 2. Mikroskopik Özellikler.....	52
IV. 2. 3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	53
IV. 2. 4. İzolat GMBAE 22'nin Kemotaksonomik	
Özellikleri.....	57
IV. 2. 5. Genotipik Özellikler.....	58
IV. 2. 5. 1. Genomik-DNA izolasyonu.....	58
IV. 2. 5. 2. 16 S rRNA geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu	
(PCR) ile çoğaltılması.....	58
IV. 2. 5. 3. 16S rRNA Dizisinin Belirlenmesi.....	59
IV. 2. 5. 3. 1. Filogenetik Ağacın Oluşturulması.....	61
IV. 3. ALKALEN PROTEAZ ENZİMİNİN	
ÜRETİMİ.....	62
IV. 3. 1. Alkalen Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması.....	62
IV. 3. 2. Alkalen Proteaz Enziminin Karakterizasyonu.....	64
IV. 3.2.1. Alkalen Proteaz Enziminin Moleküler	
Ağırlığının Belirlenmesi.....	64
IV. 3. 2. 2. Sıcaklığın Proteaz Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine	
Etkisi	65
IV. 3. 2. 3. Proteolitik Aktivite Üzerine pH'nın Etkisi	66
IV. 3. 2. 4. Michaelis Menten Kinetik Sabitlerinin	
Belirlenmesi.....	67
IV. 3. 2. 5. Fenilmetilsulfonilflorür Varlığında Enzim	
Aktivitesi.....	68

BÖLÜM V. TARTIŞMA, DEĞERLENDİRME ve

ÖNERİLER.....69

V. 1. TARTIŞMA.....69

V. 1. 1. Mikroorganizmaların Enzim Profillerinin Belirlenmesi.....69

V. 1. 2. Kültürel, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikler.....70

V. 1. 3. Kemotaksonomik Özellikler.....74

V. 1. 4. Alkalen Proteaz Enziminin Üretimi ve Kısmi
Saflaştırılması.....74

V. 1. 5. GMB AE 22 Proteazının Karakterizasyonu.....75

V. 2. DEĞERLENDİRME.....78

V. 3. ÖNERİLER.....80

VI. KAYNAKLAR.....81

Bildiri ve yayınlar.....90

EKLER

EK A. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Boyalar.....91

EK B. Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Varlığının Gösterilmesi.....96

EK C. İzolatların Işık Mikroskopundaki Görüntüleri.....100

EK D. İzolatların Nutrient Agar, TSA ve Üre Agar
Üzerindeki Üreme Biçimleri.....110

EK E. API 50 CH Testinin 48 Saatlik Sonuçları.....121

EK F. Yağ Asidi Test Sonuçları.....124

EK H. Alkalen Proteaz Aktivitesi ve Protein Miktarı
Tayini İçin Standart Grafikleri.....125

EK I. 1. Blast Tarama Sonuçları.....126

2 . *Bacillus clausii* GMB AE 22 16S rRNA Dizisi.....130

EK J. MASCOT Tarama Sonuçları

ÖZGEÇMİŞ.....132

ÖZET

Yerel Ekosistemlerden İzole edilen ve Endüstriyel Önemi olan Proteinleri Üreten Bakterilerin İzolasyonu, Tanımlanması ve İlgili Proteinlerin Taranması

Bu çalışmada, Marmara Bölgesinde bulunan sıcak su kaynaklarından ve komposttan izole edilen 146 bakteri kültürü, endüstriyel önemi olan proteaz, endoglukonaz, amilaz ve lipaz gibi enzimleri üretebilirlikleri açısından taranmıştır. Toplam izolatlar içerisinde alkalen proteaz, endoglukonaz, amilaz ve lipaz üretebilen izolatlar sırası ile %80.3, %45.26, %16.06, %16.06 olarak bulunmuştur. Fenotipik özelliklerine göre 146 bakteri kültüründen 19 izolat seçilmiştir. 17 proteaz üreticisi *Bacillus* cinsi alkalofilik türü bakterilere % 80 benzerlik göstermektedir. Moleküler yöntemle tanımlanan *Bacillus clausii* GMBAE 22 en iyi alkalen proteaz üreticisi olarak bulunmuştur.

Bu tez kapsamında, yeni izole edilmiş *Bacillus clausii* GMBAE 22' nin ürettiği serin alkalen proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonu da çalışılmıştır. *Bacillus clausii* GMBAE 22' den elde edilen enzim; protein bakımından zengin ortamda pH 10.5' da 2 gün 37°C' de çalkalayıcı inkübatörde üretilmiştir. En yüksek alkalen proteaz enzim aktivitesi hücre kültürasyonunun geç durağan fazında belirlenmiştir. Kültürden filtre edilen enzim; (NH₄)₂SO₄ çöktürmesini takiben, DEAE-Selüloz kromatografisi ile kısmen saflaştırılmıştır. Enzimin saflaştırma katsayısı 2.66, verimi ise %14.69 olarak elde edilmiştir. Enzimin moleküler ağırlığı; SDS-PAGE analizi kullanılarak 25.4 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C bulunmuştur; bununla beraber ortama 5 mM konsantrasyonda Ca⁺² iyonları ilave edildiğinde optimum sıcaklık 70°C' ye değişmektedir. Enzimin, pH 10.5' da 30-40°C arasında 2 saat kararlı olduğu, 50°C' de ise aktivitesinin %35' ini kaybettiği belirlenmiştir. Enzimin optimum pH' sı 12 olarak bulunmuştur. Enzim; 30°C' de pH 9.0 – 11.0 arasında 24 saat boyunca kararlıdır. Enzim aynı koşullarda pH 12.0' de %96.70 ve 12.5' de ise %20.14 oranında aktivitesini

koruyabilmiştir. Enzim; PMSF varlığında tamamen inhibe olduğu için bir serin alkalın proteazdır. K_m ve k_{cat} değerleri sırasıyla 1.32 mg ml^{-1} , 469.51 dak^{-1} olarak bulunmuştur.

Bu çalışma BSE-073/1311 numaralı Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAPKO) tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyon, Endüstriyel Önemi Olan Enzimler, *Bacillus clausii*, Serine Alkalen Proteaz, Enzim Saflaştırılması, Enzim Karakterizasyonu.

KASIM, 2005

Hülya BAL

ABSTRACT

Isolated and Identified, Bacterial Cultures were Screened in Order to Estimate Their Ability for Production of Industrially Important Enzymes From Local Ecosystems.

In this study, 146 bacterial cultures were isolated from the composts and hot spring waters located in Marmara Region of Turkey. Isolated cultures were screened in order to estimate their ability for production of industrially important enzymes such as alkaline protease, endoglucanase, amylase and lipase. The isolates that are able to produce alkaline protease, amylase, endoglucanase, lipase were found to be 80.3%, 45.26%, 16.06%, 16.06% of the total isolates respectively. 19 of the 146 bacterial cultures were selected for further phenotypic characterisation. 17 alkaline protease producers were shown 80% similarity with the alkaliphilic type species of *Bacillus* genus. The isolate *Bacillus clausii* GMBAE 22 was found to be as best alkaline protease producer. It is identified with chemotaxonomic and molecular methods.

The purification and characterization of a serine alkaline protease produced by newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 22 was also studied. The enzyme was produced in protein rich medium by shaking of *B. clausii* GMBAE 22 cultures for 2 days at pH 10.5 and 37°C. The highest alkaline protease activity was observed at the late stationary phase of cell cultivation. The enzyme in culture filtrate was partially purified by DEAE-cellulose chromatography following the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation step. 2.66-fold purification of enzyme was succeeded with 14.69% yield. The molecular weight of enzyme was found to be 25.4 kDa by SDS-PAGE analysis. Optimum temperature of enzyme was estimated as 60°C, however it is shifted to 70°C after addition of Ca^{2+} ions in 5 mM concentration. The enzyme was stable between 30-40°C for 2 h at pH 10.5.

Only 35% activity loss was observed at 50°C. Optimal pH of the enzyme was found to be 12. Enzyme was also stable in pH 9.0 – 11.0 range for 24 h at 30°C, however, 96.70 and 20.14% activity protections were observed at pH values 12.0 and 12.5 respectively. The strong inhibition of enzyme by PMSF treatment suggested that enzyme is a serine alkaline protease. K_m and k_{cat} values were found to be 1.32 mg ml⁻¹, 469.51 dak⁻¹ respectively.

This work was supported by The Scientific Research Projects Council (BAPKO) of Marmara University, with BSE-073/1311.

Key Words: Phenotypic and Genotypic Characterisation, Industrially Important Enzymes, *Bacillus clausii*, Serine Alkaline Protease, Enzyme Purification, Enzyme Characterisation.

November, 2005

Hülya BAL

YENİLİK BEYANI

Yerel Ekosistemlerden İzole edilen ve Endüstriyel Önemi olan Proteinleri Üreten Bakterilerin İzolasyonu, Tanımlanması ve İlgili Proteinlerin Taranması

Proteaz enzimi, ülkemizde tekstil, deri ve deterjan sanayiinde en sık kullanılan enzimlerin başında gelmektedir. Endüstrinin düşük ve yüksek sıcaklıklarda, özellikle alkalen koşullarda yüksek aktiviteye ve kararlılığa sahip proteaz enzimine gereksinimi vardır ve ilgili sektörler gereksinimlerini ithalatla karşılamaktadırlar.

Ticari olarak üretilen ve kullanılan enzimlerin çok büyük bir kısmı mikrobiyal organizmalar tarafından üretilmekte ve endüstriyel enzim kullanımı tüm dünyada büyük bir hızla artmaktadır. 1983 yılında 400 milyon dolar olan enzim kullanımı, 1995 yılında 1 milyar dolara erişmiş olup, 2005 yılında 1.7 ile 2 milyar dolara ulaşması beklenmektedir. Dünyadaki enzim pazarının %75'ini proteazlar oluşturmaktadır. Bilindiği gibi dünyadaki enerji kaynakları her geçen gün azalmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda deterjan endüstrisi, düşük sıcaklıklarda ve yüksek pH değerlerinde aktif olabilen endüstriyel önemi olan proteinlerin, alkalen proteaz gibi enzimlerin arayışına girmiştir.

Bu nedenle tez çalışması kapsamında hedeflenen, Ülkemizin çeşitli ekolojik ortamlarından izole edilmiş bakteriler arasından en iyi alkalen proteaz üreticisinin belirlenmesi, tanımlanması ve alkalen proteaz enziminin üretimi ve saflaştırılmasıdır. Bu çalışma ile özellikle deterjan ve dericilik endüstrilerinde kullanılabilecek alkalen proteaz enziminin geliştirilmesi amaçlanırken temel bilimsel çalışmalarla özgün bilgiler üretilerek uluslararası literatüre katkıda bulunulacak nitelikte bilgi birikimi oluşturulacaktır.

Tez kapsamında yerel ekosistemlerden izole edilen 22 numaralı izolat, *Bacillus clausii* olarak tanımlanmıştır. *Bacillus clausii* GMBAE 22 adı ile NCIB (National Center

for Biotechnology Information) Gen Bankası'ndan DQ131908 aksesiyon numarası alınmıştır.

Fermentasyonla üretilen hücre dışı enzim için laboratuvar ölçeğinde bir saflaştırma prosesi geliştirilmiştir. Tez çalışması sonucunda *Bacillus clausii* GMBAE 22'den elde edilen alkalen proteaz enzimi, ticari deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanılabilme özelliği göstermektedir.

Kasım, 2005

Prof. Dr. Dilek KAZAN

Hülya BAL

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

TÜBİTAK	: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
GMBAE	: Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü
BAPKO	: Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
B	: <i>Bacillus</i>
pH	: Asitlik derecesi
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal RNA
bç	: Baz çifti
His	: Histidin amino asiti
Asp	: Aspartik asit amino asiti
Ser	: Serin amino asiti
L	: litre
gr	: gram
mg	: miligram
µg	: Mikro gram
ml	: Mili litre
µl	: Mikro litre
M	: Molar
mM	: Mili molar
pmol	: piko mol
nm	: nano metre
rpm	: Snatrifüj rotorunun dakikadaki devir hızı
TSA	: Trypton Soya Agar
TSB	: Trypton Soya Broth
V-P	: Voges Proskauer
TCA	: Trikloroasetik asit
CTAB	: Heksadesil trimetil amino bromür
TE	: Tris-Etilen daimin tetraasetik asit
TAE	: Tris-asetat tampon
TBE	: Tris-borat tampon
dNTP	: Deoksiribonükleosid trifosfat

Taq DNA polimeraz : Termotabil enzimlerden *Thermus aquaticus*' dan elde edilen enzim

PCR : Polimeraz Chain Reaction
TEMED : N,N,N',N'-Tetrametilentilendiamin
SDS : Sodyum dodesil sülfat
PAGE : Poliakrilamid jel elektroforezi
DEAE : Dietilaminoetil
BSA : Sığır serum albumini
PMSF : Fenilmetilsülfonilflorür
PDAB : Paradimetil Amino Benzaldehit

K_m , V_m , k_{cat} : Michaels Menten kinetik sabitleri
S : Substrat
E : Enzim

API, CHB, CH : Analytical Profile Index, BioMerieux, Hazır karbonhidrat asimilasyon testleri

Sherlock-MIDI : Sherlock Microbial Identification System

ABI : Applied Biosystem, DNA dizileme cihaz markası
NIT 1, 2 : Nitrat Redüksiyon Kiti, BioMerieux, Fransa
Blast : Basic Local Alignment Search Tools
UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages
Spec : Spektrofotometre
U : Ünite
CFU : Canlı hücre sayısı

DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen,
Alman Kültür Koleksiyonu
NCIB : National center for Biotechnology Information,
Ulusal Biyoteknolojik İnfomasyon Merkezi (ABD)

NLM : National Library of Medicine,
Ulusal Tıp Kütüphanesi (ABD)
NIH : National Institutes of Health, Ulusal Sağlık Enstitüsü
EMBL : European Molecular Biology Laboratories,
Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı

diğ : Diğerleri
dak : dakika

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>SAYFA</u>
	<u>NO</u>
Şekil II.1 Serin Proteazların Katalitik Etki Mekanizması.....	5
Şekil IV.1 Seçilen 17 İzolatın Toplam Enzim Aktivite Grafiği.....	48
Şekil IV.2 Seçilen 17 İzolatın Büyüme Grafiği.....	49
Şekil IV.3 Seçilen 5 İzolatın Toplam Enzim Aktivite Grafiği.....	50
Şekil IV.4 Seçilen 5 İzolatın Büyüme Grafiği.....	51
Şekil IV.5 GMB AE 22 Nolu İzolata ait %0.7'lik Jelde Genomik-DNA.....	58
Şekil IV.6 1: GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas, USA) Range : 14 fragments : 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250. 2: PCR ürünü.....	59
Şekil IV.7 İzolat GMB AE 22' nin Filogenetik Ağacı.....	61
Şekil IV.8 100 ml' lik ortamda izolat GMB AE 22' in zamana bağlı büyüme ve alkalen proteaz üretimi grafiği.....	62
Şekil IV.9 DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi.....	63
Şekil IV.10 Alkalen Proteaz Enziminin pH:8,3 Tris-Glisin Tamponunda 1,5 Saat Süre ile 150 Volt'luk Gerilim Altında %12'lik Jelde SDS-PAGE elektroforezi. Kolon 1; Protein Standartlarının Moleküler Ağırlıkları, Kolon 2; Alkalen Proteaz Kolon Eluatı (PMSF).....	64
Şekil IV. 11 Sıcaklığın proteolitik aktivite ve stabilite üzerine etkisi.....	66
Şekil IV. 12 pH'nın proteolitik aktivite ve stabilite üzerine etkisi.....	67
Şekil IV. 13 GMB AE 22'den elde edilen alkalen proteaz enziminin Lineveawer-Burk diyagramı.....	68

TABLO LİSTESİ

	<u>SAYFA NO</u>
Tablo II.1 Proteazların Sınıflandırılması	4
Tablo III.1 Sıcaklığa Bağlı Olarak Değişen İnkübasyon Süreleri.....	28
Tablo III. 2 API Şeritlerin Kompozisyonu.....	31
Tablo IV.1 Enzim Profilleri.....	44
Tablo IV.2 Seçilen 17 İzolatın Alkalen Proteaz Enzim Aktiviteleri.....	47
Tablo IV.3 Seçilen İzolatların Koloni Karakterizasyonu.....	52
Tablo IV.4 Seçilen İzolatların Işık Mikroskopunda Yapılan Ölçüm Sonuçları.....	53
Tablo IV. 5 Seçilen 19 İzolatın Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	54
Tablo IV. 6 Karbonhidrat Asimilasyon Testinin Sonuçları (API 50 CH testleri).....	55
Tablo IV.7 İzolat GMB AE 22 ve <i>Bacillus clausii</i> DSM 8716 ^T yağ asidi profili.....	57
Tablo IV.8 GMB AE 22 nolu İzolatın Ürettiği Alkalen Proteazının Saflaştırılma Profili.....	63
Tablo IV.9 GMB AE 22’ den Elde Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Hammersten Kazein Hidrolizine ait Michaelis-Menten Kinetik Parametreleri	68
Tablo V.1 İzolat GMB AE 22’ nin Fenotipik Özellikleri.....	72
Tablo V.2 İzolat GMB AE 22 ve Referans Soy <i>Bacillus clausii</i> DSM 8716 ^T ’ nin Karbonhidrat Kullanım Profili.....	73
Tablo V.3 GMB AE 22 Proteazının Ticari Proteazlar ile Karşılaştırılması.....	79

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Mikroorganizmalar biyoteknolojik süreçlerin üretkenliğini belirleyen temel unsurlar olduğundan, bir biyoteknolojik sürecin onlarsız geliştirilmesi düşünülemez. Mikroorganizmalar ya da onların enzimlerinin kullanıldığı süreçler günümüzde gittikçe artan bir ivme ile kimyasal süreçlerin yerini almaktadır. Enzimatik süreçlerin çevre kirliliğine daha az yol açması, kimyasal süreçlerden daha ılımlı koşullarda ve ekonomik olarak gerçekleştirilebilmeleri sebebi ile enzimlerin, tekstil deri ve deterjan endüstrileri ve atık giderme süreçlerinde kullanımında büyük artışlar olmuştur. Bu güne kadar tanımlanan 3000 den fazla farklı enzimin büyük çoğunluğu mezofilik mikroorganizmalardan elde edilmiştir. Bunlar esas olarak dar pH aralığında ve düşük sıcaklıklarda işlevlerini gerçekleştirebilirler. Endüstrinin tercih ettiği geniş pH aralığı ve yüksek sıcaklık koşullarında bu enzimler kullanılamamaktadır. Çeşitli ekstrem çevrelerden izole edilen ve ekstremofil olarak adlandırılan mikroorganizmalar, endüstrinin arzuladığı nitelikteki enzimlerin elde edilmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır.

Mikroorganizmaların çoğu nötral veya buna yakın pH değerlerinde yaşarlar. Alkalifilik mikroorganizmalar yüksek alkali çevrelerde yaşayan farklı bir gruptur. Alkalifilikler ve alkalitolerantlar olarak iki dar grup altında kategorize edilebilirler. Alkalifilikler pH 10' un üzerinde büyüeyen pH 7' de büyüme kabiliyeti olmayan

organizma grubudur. Bununla beraber alkalitolerant organizmalar pH 7 ve pH 10' un üzerine büyüme kabiliyetindedir (Nielson ve diğ., 1995, Kumar ve Takagi, 1999).

Fermentasyonla üretilen yüksek katma değerli ürünlerin başında enzimler gelir. Dünya enzim pazarı değerlendirildiğinde tek bir büyük pazardan çok endüstriyel enzimler, gıda enzimleri ve hayvan gıdası enzimlerini kapsayan üç ayrı pazarın varolduğu görülmektedir. Endüstriyel enzimler deterjan, tekstil sanayi ve diğer teknik uygulamalarda kullanılmaktadır.

Son yıllarda gerek biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, gerekse çevre duyarlılığının artması sonucu, enzimlerin çeşitli endüstri kollarında kullanımı, diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de giderek yaygınlaşmıştır. Endüstriyel enzimler ülkemizde en çok tekstil ve deterjan sanayiinde kullanılmakta olup, bunu gıda ve deri endüstrisi izlemektedir. Deterjan sanayiinde proteaz, amilaz, selüloz ve lipaz enzimleri kullanılmaktadır.

Yüksek sıcaklık ve pH' larda büyüyen *Bacillus* soyu mikroorganizmalar tarafından üretilen ve endüstriyel önemi olan enzimler, deterjanlara katkı maddesi olarak eklenmekte sıcak su ile daha etkin temizlik sağlayarak yıkama olanağını vermektedir. Biyoteknolojide uygulama olanağı bulacağı düşüncesi termofilik enzimlere olan ilgiyi arttırmıştır. Dolayısıyla tekstil ve deterjan endüstrisinde özellikle termofilik ve alkalifilik bakterilerin ürettiği endüstriyel önemi olan proteinlerin üreticisi olan *Bacillus* soylarının taranmasına, izolasyon ve nitelendirilmesine yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır (Fritze ve diğ., 1990; Ferrero ve diğ., 1996; Ito ve diğ., 2001; Singh ve diğ., 2001b; Ivanova ve diğ., 1993; Takami ve diğ., 2000).

Alkalifilik mikroorganizmalar doğada yaygın olarak tüm çevreye dağılmışlardır. Alkalifilik *Bacillus* türlerinin insan ve hayvan dışkılarından izolasyonu ile ilgili ilk rapor Vedder A, (1934) tarafından verilmiştir. Bugün alkalifilik *Bacillus* türleri özellikle biyoteknolojik uygulamalar nedeni ile oldukça önem kazanmıştır (Fritze ve diğ., 1990; Kumar ve Takagi, 1999). Fritze ve diğ. (1990) ve Nielsen ve diğ. (1995). Son 20 yılda alkalifilik *Bacillus* türlerinin sınıflandırmasında filogenetik ve genetik karakteristiklerine göre revize ederek yeniden oluşturmuşlar ve daha önce tarif edilen *B. alcalophilus* ve *B. cohnii* 'ye ilave olarak *B. clausii*, *B. gibsonii*, *B. horikoshii*, *B. pseudoalkaliphilus*, *B. pseudofirmus*, *B. agaradhaerens*, *B. clarkii*, *B. halmapalus*, *B. halodurans* olarak 9 yeni tür tarif etmişlerdir.

Dünyadaki enzim pazarının %75' ini oluşturan proteazlar, proteinleri degrade ederek neden oldukları kirliliklerin uzaklaştırılmasında kullanılır. Çok çeşitli *Bacillus* soyları hücre dışına serin endoproteazlar salgılamaktadır. *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, soylarında proteaz genleri klonlanarak dizi analizleri yapılmıştır. *Bacillus* serin proteazlarının en iyi bilinen uygulama alanı deterjan tozlarındadır. Deterjanlarda, yüksek alkali pH optimumları olan serin proteazlar tercih edilmektedir. *Bacillus* soylarından elde edilen , alkali serin proteazlar genellikle 8.5-10 aralığında bir pH optimumuna sahiptirler. pH optimumu ileri derecede alkali olan bir proteaz üreten *Bacillus alcalophilus* soyu (pB92) topraktan izole edilmiştir. Bu soy tarafından kodlanan serin proteaz geni klonlanarak, proteaz üretim düzeyini arttırmak üzere kullanılmıştır. pH optimumu 10.5-12 olan bu proteaz modern deterjan tozlarında kullanılmak çok uygundur (Van der Laan ve diğ., 1991).

Alkalifilik mikroorganizmalar içerisinde proteaz aktivitesi *Bacillus* genusu üyeleri içerisinde yaygın olarak bulunmaktadır (Kumar and Takagi 1999). Bu nedenle, alkalifilik *Bacillus* soyları hem akademik hem de endüstriyel açıdan ilginç ve çok önemlidir. Bu amaçla verilen literatür bilgileri gözeticilerle, tanımlanan lokal ekosistemlerden izole edilen *Bacillus* soyları, öncelikli olarak alkali proteaz aktivitesi yönünden taranmıştır.

Bu tezin temel amacı; Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü (GEMBAE) Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı ile birlikte kolaboratif bir çalışmayla; ülkemizdeki yerel ekosistemlerden taranarak izole edilen ve endüstriyel önemi olan proteinleri üreten bakterilerin tanımlanması, en iyi alkali proteaz üreticisinin belirlenmesi ve alkali proteaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonudur.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II. 1. Mikrobiyal Proteazlar

Mikrobiyal proteazlar üç farklı grupta incelenebilir. Bunlardan birincisi, pH 5-8 aralığında ve düşük sıcaklıklarda aktif bakteriyel nötral proteazlardır. Hidrofobik amino asit çiftlerine yüksek afiniteleriyle karakterize edilirler. Bakteriyel alkalen proteazlar geniş substrat spesifisitesi ve alkalen pH'daki yüksek aktivitesiyle karakterize edilirler. Optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 60°C ve pH 10'dur. Bu özellikleri nedeni ile deterjan endüstrisinde genellikle bakteriyel alkalen proteazlar kullanılmaktadır.

Mikrobiyal proteazlar içerisindeki bir diğer grup fungal proteazlardır. Fungal proteazlar pH 4-11 arasında aktiftirler ve geniş substrat spesifisitesi gösterirler. Düşük reaksiyon hızlarına sahiptirler. Fungal asit proteazlar pH 4-4.5 arasında optimuma sahiptirler, pH 2.5-6 arasında kararlıdır. Fungal nötral proteazlar metalloproteazlardır; pH 7' de aktiftirler ve şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe olurlar. Fungal alkalen proteazlar da besin protein modifikasyonunda kullanılırlar. Ayrıca bazı virüslerde de serin, aspartik, sistein peptidazlar bulunur.

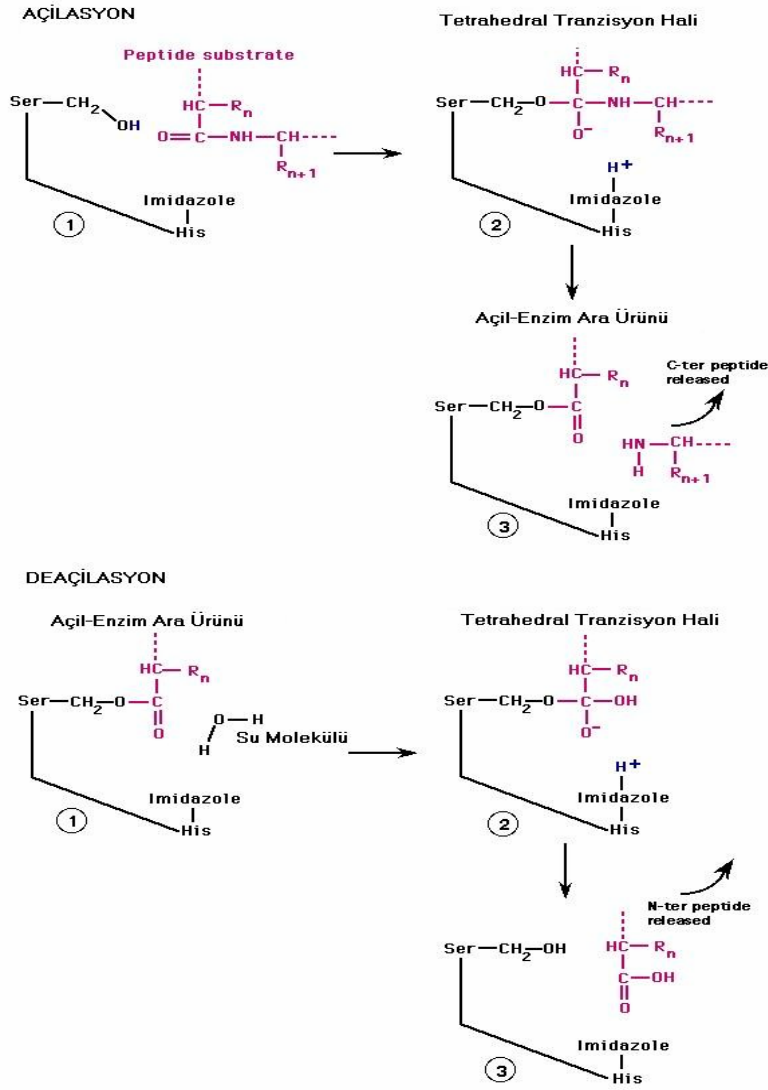
Bakterilerden özellikle yüksek sıcaklık ve pH' larda büyüyen bir *Bacillus* soyu tarafından üretilen proteaz enzimleri, deterjanlara katkı maddesi olarak eklenmekte sıcak su ile daha etkin temizlik sağlayacak yıkama olanağını vermektedir. Biyoteknolojide uygulama olanağı bulacağı düşüncesi termofilik enzimlere olan ilgiyi arttırmıştır. Dolayısıyla tekstil ve deterjan endüstrisinde özellikle termofilik ve alkalifilik mikroorganizmaların ürettiği amilaz ve proteaz üreticisi *Bacillus* soylarının taranmasına,

izolasyon ve nitelendirmesine yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır (Fritze ve diğ., 1990, Fritze, 1996, Nielsen ve diğ., 1994, Nielsen ve diğ., 1995, Singh ve diğ., 2001a, Ito ve diğ., 1998, Ferrero ve diğ., 1996).

Proteazlar genelde katalizlediği reaksiyon, katalitik bölgenin kimyasal yapısı ve oluşumuyla ilişkili olmak üzere, 3 ana kritere göre sınıflandırılır. Proteazlar katalizlediği reaksiyonlarla ekzopeptidaz ve endopeptidaz olmak üzere 2 alt sınıfa ayrılır. Ekzopeptidazlar katalitik mekanizma temeline göre sınıflandırılırlar (Tablo II.1). Serin peptidazlar katalitik işlemde aktif bölge merkezinde serin, sistein tip peptidazlar aktif merkezde sistein içerir. Aspartik tip endopeptidazlar katalitik bölgesinde katalitik aktiviteleri için iki aspartik aside ihtiyaç duyar. Metallopeptidazlar, katalitik mekanizmasında yaygın olarak çinko veya metal iyonlarını kullanırlar. Bir kısım endopeptidaz ise henüz katalitik aktivite mekanizması tanımlanamadığı için yukarıda belirtilen grupların dışında EC 3.4.99 alt sınıfında listelenmiştir.

Tablo II.1. Proteazların Sınıflandırılması

Peptidazlar	Alt Sınıf
Ekzopeptidaz (Karboksipeptidaz)	
Serin-tip karboksipeptidazlar	3.4.16
Metallo karboksipeptidazlar	3.4.17
Sistein- tip karboksipeptidazlar	3.4.18
Endopeptidaz	
Serin endopeptidazlar	3.4.21
Sistein endopeptidazlar	3.4.22
Aspartik endopeptidazlar	3.4.23
Metalloendopeptidazlar	3.4.24
Katalitik Mekanizması Bilinmeyen Endopeptidazlar	3.4.99



Şekil II.1. Serin Proteazların Katalitik Etki Mekanizması.

Serin proteazlar; kimotripsin, tripsin ve elastaz gibi enzimleri içeren kimotripsin tip ve subtilisin gibi bakteriyel enzimleri içeren subtilisin tip olmak üzere 2 farklı grupta incelenir. Bu iki grubun, katalitik mekanizmaları ve aktif bölge yapıları aynı olmasına rağmen, genelde 3 boyutlu yapıları farklıdır. Katalitik bölgede katalizden sorumlu amino asitler His 57, Asp 102 ve Ser 195'dir. Kataliz reaksiyonundaki ilk basamak, serin ile substrat arasında açıl enzim ara ürününün oluşumudur. Bunu takiben negatif yüklü tetrahedral geçiş hali oluşur ve peptid bağı ayrılır. İkinci aşamada oluşan açıl enzim ara ürünü bir su molekülü ile hidrolizlenerek, peptidin ayrılması ile serin-hidroksil tekrar oluşur (Şekil II.1).

Alkalen proteazlar serin proteaz (EC 3.4.21), sistein proteaz (EC 3.4.22), aspartik proteaz (EC 3.4.23) ve metallo proteaz (EC 3.4.24) olmak üzere deterjan, gıda ve deri endüstrisinde kullanılan endüstriyel enzimlerin en önemli gruplarından birini oluştururlar.

Deterjanlara alkalen proteaz ilavesinin amacı protein kökenli lekeleri %35-40 uzaklaştırarak temizleme etkisini arttırmaktır (Moreira ve diğ., 2002). Ayrıca alkalen proteazlar tüy, deri ve boynuzların kullanılabilir biyokütleyle çevirilmesi amacı ile fibröz proteinlerin hidrolizlenmesinde de kullanılmaktadır. Alkalen proteazların diğer endüstriyel uygulamaları peptit sentezi, aminoasitlerin rasemik karışımlarının ayrılması, X-ray filmlerindeki jelatinin hidroliziyle gümüşün geri kazanımını kapsamaktadır (Anvar ve Saleemuddin 1998, Kumar ve Takagi 1999).

Alkalifilik ve termofilik mikroorganizmalardan özellikle deterjan endüstrisinin kullanımına yönelik enzimlerin üretimine ilişkin çalışmalarda da artış görülmektedir (Phadatare ve diğ., 1993, Jasvir ve diğ., 1999, Abdel-Naby ve diğ., 1998, Macbrouk ve diğ., 1999, Mehrotra, S., 1999, Johnvesly ve Naik, 2001, Kaur ve diğ., 2001, Oberoi ve diğ., 2001). Diğer taraftan bu organizmalardan ilgili enzimler saflaştırılmakta ve karakterizasyonları rapor edilmektedir (Singh ve diğ., 2001b, Huang ve diğ., 2003, Rahman ve diğ., 1994, Bauerjae ve diğ., 1999). Alkalifilik *Bacillus* türlerinden elde edilen alkalen proteaz biyoteknolojik uygulamalarda önemli oranda potansiyel oluşturur (Saeki ve diğ., 2002, Takami ve Horikoshi, 2000, Takami ve Krulwich, 2000, Jasvir ve diğ., 1999, Takami ve diğ., 1999, Yumoto ve diğ., 1998). Son yıllarda ülkemizde özellikle serin alkalen proteaz üretimine yönelik “metabolik akış” analizlerini de içeren nitelikli çalışmalar yayınlanmıştır (Çalık ve diğ., 1998, 1999a, 1999b, 2000a, 2000b, 2000c, 2001).

BÖLÜM III

TEZ ÇALIŞMALARI

III. 1. Araştırma Araçları

III. 1.1. Araştırma Olanakları (Cihaz vb)

Araştırma, TÜBİTAK-GMBAE, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı ile kolaboratif olarak gerçekleştirilmiştir.

III. 1.2. Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya), Fluka (İsviçre), Sigma (St Louis, ABD) ve BioMerieux (Fransa), Oxoid Ltd (Hampshire, İngiltere), Difco (Michigan, Amerika), Riedel (Seelze, Almanya), JT Baker (Deventer, Hollanda)' dan sağlanmıştır.

III. 1. 3. Mikroorganizma

Bu çalışmada, TÜBİTAK-GMBAE, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı tarafından, farklı yerel ekosistemlerden taranarak izole edilen [İzole edilen

saf kùltürler -80°C’ de (Snijders Scientific biolab, Holland) % 30 gliserolde stoklanmışlardır], ön seleksiyonları yapılmış, endüstriyel önemi olan proteinleri üreten bakteriler kullanılmıştır.

III. 1 .4 . Besiyerleri

Besiyeri 1. Nutrient Broth

13 gr Nutrient broth (Oxoid CM 1) 1 litre distile suda çözüldükten sonra, 121 °C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiş ve aseptik koşullarda steril kapaklı tüplere 5’er ml olarak paylaştırılmıştır (Bergey’s, 1986). Bu ortam izolatların aktivasyonu için kullanılmıştır.

Besiyeri 2. Alkali Nutrient Broth

13 gr Nutrient broth, 1 litre distile suda çözüldükten sonra, 121 °C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Alkali koşullarda gerçekleştirilen deneyler için ortam pH’sı içeriği Ek A’ da verilen sodyum sesquikarbonat kullanılarak 10.5 değerine ayarlanmıştır. Sodyum sesquikarbonat aynı koşullar altında ayrı olarak steril edilmiş, son hacimde %1 olacak şekilde bazal ortama ilave edilmiştir. Hazırlanan çözelti aseptik koşullarda steril Petrilere dökülmüştür (Bergey’s, 1986). Nötral çalışmalarda ise ortam pH değeri 7.2 olarak ayarlanmıştır. Bu ortam izolatların aktivasyonu için kullanılmıştır.

Besiyeri 3. Tripton Broth

10 gr/L Tripton (Oxoid L 42) distile suda çözüldükten sonra 121 °C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiş ve 5 ml kapaklı tüplere paylaştırılmıştır (Bergey’s, 1986). Bu ortam izolatların indol üretimini belirlemek için kullanılmıştır.

Besiyeri 4. Tripton Soya Broth (TSB)

30 gr/L Tripton soya broth (Oxoid CM129) 1 litre distile suda çözüldükten sonra, 121 °C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiş ve aseptik koşullarda 5 ml kapaklı tüplere paylaştırılmıştır (Tamer ve diğ., 1989). Bu ortam hücresel yağ asidi analizinde izolatların aktivasyonu için kullanılmıştır.

Besiyeri 5. Nitrat Broth

1 gr/L KNO_3 , 0,5 gr/L NaCl ve 2 gr/L Pepton distile suda çözüldükten sonra, kapaklı tüplere 5' er ml paylaştırılmıştır. Steril Durham tüpleri içinde hava kalma-yacak şekilde tüplere yerleştirildikten sonra 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir (Tamer ve diğ., 1989). İzolatların nitrat redüksiyonunun belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 6. Voges-Proskauer (V-P) Broth

Bakto pepton (Difco, 0118-01-8)	7 gr
Glukoz (JT Baker 0115)	5 gr
NaCl	5 gr
Distile su	1000 ml

Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, pH: 6,5' a ayarlanarak 20 mm'lik kapaklı tüplere beşer ml paylaştırılmış ve 121°C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Voges-Proskauer Broth ortamında asetilmetil karbinol üretiminin belirlenmesinde kullanılmıştır (Bergey's, 1986).

Besiyeri 7. Lizozim Ortamı

Steril olarak hazırlanan 99 ml nutrient broth içine 10 000 unit/ml olacak şekilde lizozim enzimi çözülmüştür. Sterilizasyondan sonra aseptik koşullarda kapaklı steril tüplere 2.5' er ml paylaştırılmıştır (Bergey's, 1986).

Besiyeri 8. Karbonhidrat Fermantasyonunun Ortamı

Bazal Ortam

K_2HPO_4	7 gr
KH_2PO_4	2 gr
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 gr
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	1 gr
NaCl	5 gr

Vitamin solusyonu	1 ml
Distile su	1000 ml

Vitamin Stok Çözeltisi

D(-) Biotin (Sigma, B-4501)	20 mg
Folik asit (Sigma, F-7876)	20 mg
Tiamin hidroklorid (Merck, 8181)	50 mg
Kalsiyum D (+) Pentationat	50 mg
Kobalamin	1 mg
Riboflavin (Merck, 7609)	50 mg
Nikotinik asit (Sigma, N-4126)	50 mg
p-aminobenzoik asit	50 mg
Pridoksin hidroklorid	100 mg
Distile su	1000 ml

Bazal ortam içerikleri 1000 ml distile suda çözüldükten sonra 121 °C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Deneyde kullanılan şekerler; D(+) Glukoz (JT Baker, 115), L(+) Arabinoz (Merck, 1488), D(+) Xyloz (Merck, 8689), D(-) Mannitol (Merck, 5982) %10’ luk distile su ile hazırlandıktan sonra filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Sonuç çözeltisine % 0.5 oranında ilave edilmiştir. Bu ortamdan ayrı olarak hazırlanan vitamin stok çözeltisinin içerikleri distile suda çözülerek membran filtre ile sterilize edilmiştir. Ayrı olarak steril edilen bazal ortama vitamin stok çözeltisinden 1 ml eklendikten sonra ortamın pH sı 8.9-9.1’e ayarlanmıştır. Asit üretiminin indikatörü olarak, ayrı olarak steril edilmiş Brom Timol Mavisi (pH: 8.0-9.6) kullanılmıştır. Bu ortam steril kapaklı cam tüpkere 5’er ml olacak şekilde paylaştırılmıştır (Fritze, 1990; Bergey’s, 1986; Onmuş F, 2000). D(+) Glukoz tüplerine gaz oluşumu için Durham tüpleri yerleştirilmiş ve önceden ayrı olarak sterilize edilmiştir.

Besiyeri 9. Nutrient agar

28 gr Nutrient agar (Oxoid CM 3) 1 litre distile suda çözüldükten sonra, 121 °C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sonuç solusyonu aseptik koşullarda steril Petrilere dökülmüştür (Bergey’s, 1986; Tamer ve diğ., 1989).

Besiyeri 10. Alkali Nutrient agar

28 gr Nutrient agar, 1 litre distile suda çözüldükten sonra, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Alkali koşullarda gerçekleştirilen deneyler için ortam pH'sı sodyum sesquikarbonat kullanılarak 10.5 değerine ayarlanmıştır. Sodyum sesquikarbonat aynı koşullar altında ayrı olarak steril edilmiş, final hacimde %1 olacak şekilde bazal ortama ilave edilmiştir. Sonuç çözültisi aseptik koşullarda steril Petri kutularına dökülmüştür (Bergey's, 1986).

Besiyeri 11. Tripton Soya Agar (TSA)

30 gr/L Tripton soya broth (Oxoid CM129), %1'lik bakteriyolojik agar 1 litre distile suda çözüldükten sonra, pH 7.6' ya ayarlanmıştır ve 121 °C'de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sonuç çözültisi aseptik koşullarda steril Petri kutularına dökülmüştür (Tamer ve diğ., 1989).

Besiyeri 12. Gliserol Agar

100 ml/L Nutrient agar, 1 gr/L, maya özütü (Merck, 1.03753) ve 2 ml/L gliserol distile suda çözüldükten sonra, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sonuç çözültisi aseptik koşullarda steril Petri kutularına (1.5-2.0 mm kalınlıkta) dökülmüştür (Bergey's, 1986). Bu ortam dihidroksi aseton üretiminin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 13. Sitrat Agar

Bazal ortam

Trisodyum sitrat 2 H ₂ O (Riedel, 25116)	1 gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.2 gr
(NH ₄) SO ₄	0,5 gr
KCl	1 gr
İz element çözültisi	40 ml
Agar (Oxoid L 11)	15 gr
Distile su	920 ml

Fenol kırmızısı (% 0,04 w/v) (Fluka, 77650)

20 ml

pH: 6.80

İz Element Çözeltisi

Etilendiamin tetra asetat (EDTA)	500 mg
FeSO ₄ 7H ₂ O	200 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	3 mg
H ₃ BO ₃	30 mg
CoCl ₂ 6H ₂ O	20 mg
CuCl ₂ 2H ₂ O	1 mg
NiCl ₂ 6H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	3 mg
Distile su	1000 ml

Bazal ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, pH 6.80' e ayarlanmış, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, iz element solusyonu membran filtreden geçirilerek eklenmiştir. İndikatör olarak Fenol kırmızısı çözeltisi (pH: 6.8-8.4) (Bergey's, 1986) kullanılmıştır. Bu ortam izolatların sitrat kullanımlarını belirlemek için kullanılmıştır.

Besiyeri 14. Simon Sitrat Agar

23 gr Simon sitrat agar (Oxoid CM 155) 1 litre distile suda çözüldükten sonra, kapaklı tüplere 5'er ml paylaştırılarak 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra tüpler yatık halde soğumaya bırakılmıştır (Tamer ve diğ., 1989; American Public Health Association, 1984).

Besiyeri 15. Fenil Alanin Agar

Maya özütü	3 gr
L-Fenil alanin (Fluka, 78020)	2 gr
Na ₂ HPO ₄	1 gr
NaCl	5 gr
Agar	12 gr

Distile su

1000 ml

Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, her organizma için iki adet olacak şekilde kapaklı tüplere 5'er ml paylaştırılmış, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Yatık olarak hazırlanan ortam, izolatların fenil alanin deaminasyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır (Bergey's, 1986).

Besiyeri 16. Tirozin Agar

0.5 gr L-Tirozin (Merck, K23565371) 10 ml distile suda çözüldükten sonra, 121°C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 25 dakika sterilize edilmiştir. Ayrı olarak sterilize edilmiş ve 100 ml nutrient agar ile karıştırıldıktan sonra aseptik koşullarda steril Petri kutularına (15 mm kalınlıkta) eşit olarak paylaştırılmıştır (Bergey's, 1986).

Besiyeri 17. DNaz Agar

39 gr/L DNase agar (Oxoid CM 321) 1 litre distile suda çözüldükten sonra, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sonuç çözeltisi aseptik koşullarda steril Petrilere dökülmüştür (Tamer ve diğ., 1989). Bu ortamda izolatların DNaz aktivitelerinin varlığı incelenmiştir.

Besiyeri 18. Üre Agar

2.4 gr Üre agar base (Oxoid CM53), 95 ml distile suda çözülmüş ve homojenize edilmiştir. 121 °C'de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir, sodyum sesquikarbonat aynı koşullar altında ayrı olarak steril edilmiştir. Agar 45°C' ye kadar soğutulduktan sonra aseptik olarak membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiş %20' lik üre çözeltisi agar ortamında son konsantrasyonu %2 olacak şekilde eklenmiş ve besiyeri steril şartlarda Petri kutularına paylaştırılmıştır (Tamer ve diğ., 1989; Onmuş F., 2000).

Besiyeri 19. %2, %5, %7, %10 NaCl İçeren Nutrient Agar

100 ml Nutrient agara sırasıyla 2, 5, 7 ve 10gr NaCl ilave edilmiş ve ortamlar 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilerek steril Petri kutularına dökülmüştür.

Bu ortamlar izolatların %2, %5, %7, %10 NaCl içeren ortamlarda büyüüp büyümediğinin saptanmasında kullanılmıştır (Tamer ve diğ., 1989; Şentürk, 1993).

Besiyeri 20. Yarı Katı Hareket Ortamı

Nutrient broth' a %1'lik bakteriyolojik agardan sonuç çözeltilisinde agar oranı % 0.5 olacak şekilde eklendikten sonra, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sonuç çözeltilisi aseptik koşullarda steril kapaklı tüplere 5' er ml paylaştırılmıştır (Tamer ve diğ., 1989). Bu ortam izolatların hareketliliğinin kontrol edilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 21. Endospor Ortamı

28 gr/L Nutrient agar ve 5 gr/L MgSO₄ 7H₂O distile suda çözüldükten sonra, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiş ve aseptik koşullarda steril Petri kutularına dökülmüştür. Ortam izolatların endospor incelemeleri için kullanılmıştır (Bergey's, 1986).

Besiyeri 22. Maksimum ve Minimum Sıcaklıklarda Büyüme

28 gr/L Nutrient agar distile suda çözüldükten sonra, 121 °C'de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sonuç çözeltilisi aseptik koşullarda steril Petri kutularına dökülmüştür. Yatık olarak hazırlanan ortamlarda maksimum ve minimum sıcaklıklarda (5 °C, 10°C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 55°C, 65 °C' de) izolatların büyümeleri incelenmiştir. En fazla sıcaklık farklılığı ±0,5 °C olacak şekilde ayarlanmış etüvler kullanılmıştır (Bergey's, 1986).

Besiyeri 23. NaCl – KCl' de Büyüme Ortamı

NaCl-KCl Ortam

Et özütü (Merck, 1.03979)	1 gr
Maya özütü	2 gr
Pepton	5 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, pH' sı 6.8' e ayarlanmıştır ve 121°C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiş ve aseptik koşullarda steril

Petri kutularına dökülmüştür. Ortam izolatların NaCl ve KCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacı için kullanılmıştır. Ayrıca üretim sıvı ortamda da tekrarlanmıştır. Sonuç ortamı; %0,5 oranda NaCl ya da KCl içerecek şekilde hazırlanmıştır (Bergey's, 1986).

Besiyeri 24. pH 5.7' de Üreme Ortamı

10 gr/L Bacto pepton ve 20 gr/L Glukoz distile suda çözüldükten sonra, pH: 5.70' e ayarlandıktan sonra kapaklı cam tüplere 5' er ml paylaştırılmış ve 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir (Bergey's, 1986).

İzolatların pH 5.7' deki büyümelerini belirlemek amacı ile Saboraud Dextroz Agar (Biomérieux, 42026), (hazır ortam) kullanılmıştır. Bu ortamlar pH: 5.7' de büyüme testi için kullanılmıştır.

Besiyeri 25. Büyüme için pH aralığı

24 saatlik inkübasyondan sonra 1 litre nutrient agar, farklı tamponlar kullanılarak farklı pH değerlerine ayarlanmıştır. Aynı şartlarda nutrient broth' ta da pH değerleri kontrol edilmiştir. İzolatlardan 131 ve 132 nolu olan izolatlar nutrient agar besiyerinde ve 55 °C' de aktive edilmiştir.

pH:6.0	HCl eklenerek ayarlamıştır.
pH:7.0	100 ml 1.0 M Sodyum fosfat tampon (pH:7.0) eklenerek ayarlanmıştır.
pH:8.0	100 ml 1.0 M Na ₂ HPO ₄ eklenerek ayarlamıştır.
pH:9.0	100 ml 1.0 M NaHCO ₃ eklenerek ayarlamıştır
pH:10.0	100 ml 1.0 M Sodyum sesquikarbonat tamponu (pH:10.0) eklenerek ayarlamıştır.

Nutrient agar ortamı ve tamponlar ayrı olarak otoklavda sterilize edilmiştir. Tamponlar 45 °C' ye soğutulmuş nutrient agar ortamına ilave edilmiştir. İyice çalkalanarak steril Petri kutularına dökülmüş olan bu ortam büyüme için pH aralığının belirlenmesinde kullanılmıştır (Nielsen ve diğ., 1995; Onmuş F., 2000).

Besiyeri 26. Proteaz Ortamı

Çözünebilir nişasta (Riedel, 18727)	10 gr
Pepton	5 gr

Maya özütü	5 gr
K ₂ HPO ₄	1 gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 gr
Na ₂ CO ₃	10 gr
Distile su	1000 ml
Skim milk (Oxoid L 31)	% 0.5
Agar	% 1
pH:10.5	

Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121 °C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortamın pH ayarı için Na₂CO₃ ayrı olarak steril edilmiş ve sonuç çözeltisine hacimde %1 olacak biçimde ilave edilmiştir. Besiyeri 27’ de içeriği verilen süt agarı (Skim milk) 121°C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 5 dakika sterilize edilmiş ve 45 °C’ ye kadar soğutulmuş, bazal ortama ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Sonuç çözeltisi aseptik koşullarda steril Petri kutularına dökülmüştür. Kolloidal olan kazein molekülleri ortam donduğu zaman ortama opak bir görünüm vermiştir. Ortam proteaz üreten izolatların belirlenmesinde kullanılmıştır (Tamer ve diğ., 1989; Horikoshi, 1971; Nomoto ve diğ., 1984; Uçar ve diğ., 1998; Oxoid, 1967).

Besiyeri 27. Süt Agarı (Skim Milk)

Susuz olarak ticari şekilde bulunan Skim milk (Oxoid L31) 10 gr/100 ml oranında distile suda çözülerek hazırlanmıştır (Oxoid, 1967; Tamer ve diğ., 1989).

Besiyeri 28. Amilaz Ortamı

Nutrient agar	28 gr
Nişasta	20 gr
Distile su	1000 ml
pH:10.5	

Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121 °C’de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sodyum sesquikarbonat tampon aynı koşullar altında ayrı olarak steril edilmiştir, son hacimde %1 olacak biçimde bazal ortama ilave edilmiştir. Sonuç çözeltisi aseptik koşullarda steril Petri kutularına dökülmüştür. Ortam amilaz üreten izolatların belirlenmesinde kullanılmıştır (Gerhardt ve diğ., 1981).

Besiyeri 29. Lipaz Ortamı

Tribütrin	5 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 gr
K ₂ HPO ₄	3.5 gr
KH ₂ PO ₄	1 gr
NaCl	2.5 gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5 gr
Agar (% 1' lik)	10 gr
Distile su	1000 ml
pH:10.5	

Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121 °C'de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sodyum sesquikarbonat tampon aynı koşullar altında ayrı olarak steril edilmiştir, son hacimde %1 olacak biçimde bazal ortama ilave edilmiştir. Sonuç çözeltisi aseptik koşullarda steril Petri kutularına dökülmüştür. Ortam lipaz üreten mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılmıştır (Rapp P. ve Backhaus S., 1992).

Besiyeri 30. Selülaz Ortamı

Trypton (Oxoid L 42)	10 gr
Maya özütü	5 gr
Karboksi metil selüloz (CMC) (Sigma, C-4888)	1 gr
NaCl	10 gr
Agar	% 1
Distile su	1000 ml
pH:10.5	

Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sodyum sesquikarbonat tampona aynı koşullar altında ayrı olarak steril edilerek, son hacimde %1 olacak biçimde bazal ortama ilave edilmiştir. Sonuç çözeltisi aseptik koşullarda steril Petri kutularına dökülmüştür. Ortam selülaz üreten mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılmıştır.

III. 2. Araştırma Yöntemi

III. 2. 1. Mikroorganizmaların Enzim Profillerinin Belirlenmesi

TÜBİTAK-GMBAE, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı tarafından, farklı yerel ekosistemlerden taranarak izole edilen, ön seleksiyonları yapılmış izolatların proteaz, amilaz, lipaz ve selüloz enzimlerini üretebilirlikleri taranmıştır.

III. 2. 1. 1. Katı Besiyerinde Enzim Profillerinin Belirlenmesi

İzolatların ürettikleri enzimlerin taranmasında, proteaz ortamı olarak Tamer ve diğ., 1989; Horikoshi, 1971; Nomoto ve diğ., 1984; Uçar ve diğ., 1998; Oxoid, 1967 tarafından önerilen ortam, amilaz enzimi için Gerhardt ve diğ., (1981) tarafından önerilen ortam, lipaz için ise Rapp ve Backhaus, 1992 tarafından önerilen ortam kullanılmıştır.

Enzim profillerinin belirlenmesinde kullanılan besiyerleri kısım III. 1. 4.' de, metodlar aşağıda, çözeltiler ise Ek A' da verilmiştir. Bütün testler üçer defa tekrarlanmıştır. Proteaz, amilaz, lipaz ve selüloz enzimlerinin profilleri Tablo IV. 1.' de verilmiştir.

III. 2. 1. 1.1. Proteaz Üretiminin Belirlenmesi

Nutrient broth'da aktive edilen izolatlardan, Besiyeri 26' de verilen proteaz ortamına, steril şartlarda 3 µl nokta ekim yapılmıştır. 24 saat boyunca optimum sıcaklıkta (37 °C) inkübe edilen kültürlerde proteaz ortamı üzerinde koloni çevresinde açık transparan zonlar oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiş ve bu zonlar milimetrik cetvelle ölçülmüştür. Katı proteaz ortamında proteaz aktivitesi görülen Petri kutularının fotoğrafları çekilmiş ve sonuçlar Ek B' de verilmiştir (Tamer ve diğ., 1989; Horikoshi, 1971; Nomoto ve diğ., 1984; Uçar ve diğ., 1998; Oxoid, 1967).

III. 2. 1. 1.2. Amilaz Üretiminin Belirlenmesi

Nutrient broth'da aktive edilen izolatlardan, Besiyeri 28' de verilen amilaz ortamına, steril şartlarda 3 µl nokta ekim yapılmıştır. 24 saat boyunca optimum sıcaklıkta (37 °C, izolat 131 ve izolat 132 için 55 °C) inkübe edilen kültürlerde amilaz ortamı üzerinde

oluşan bakteri kolonisinin üzerine Gram iyodür (lugol) çözeltisi damlatıldığında koloni çevresinde açık zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Gerhardt ve diğ., 1981).

III. 2. 1. 1.3. Lipaz Üretiminin Belirlenmesi

Nutrient broth'da aktive edilen izolatlardan, Besiyeri 29' da verilen lipaz ortamına, steril şartlarda 3 µl nokta ekim yapılmıştır. 24 saat boyunca optimum sıcaklıkta (37 °C, izolat 131 ve izolat 132 için 55 °C) inkübe edilen kültürlerde lipaz ortamı üzerinde oluşan koloni çevresinde açık transparan zonlar oluşması, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Rapp P. ve Backhaus S.; 1992).

III. 2. 1. 1.4. Selülaz Üretiminin Belirlenmesi

Nutrient broth'da aktive edilen izolatlardan, Besiyeri 30' da verilen selülaz ortamına, steril şartlarda 3 µl nokta ekim yapılmıştır. 24 saat boyunca optimum sıcaklıkta (37 °C, izolat 131 ve izolat 132 için 55 °C) inkübe edilen kültürlerde selülaz ortamında koloninin üzerine %1' lik Kongo Kırmızısı damlatılmıştır. Boyanın fazlası 1 N HCl ile yıkanmıştır. 15 saniye sonucunda koloni çevresinde açık transparan zonlar oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

III. 2. 1. 2. Sıvı Besiyerinde Proteaz Üretiminin Belirlenmesi

Seçilen 17 izolat sıvı proteaz üretim ortamında büyütülerek enzim profilleri belirlenmiştir. Alkalen proteaz enzimi üretimi; %1.0 Çözünebilir nişasta, %0.5 Maya özütü, %0.5 Pepton, %0.1 K₂HPO₄, %0.02 MgSO₄.7H₂O içeren kompleks sıvı besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Ortam pH'sı %10 sodyum sesquikarbonat ile 10'a ayarlanmıştır. Seçilen 17 izolat, 100 ml alkalen proteaz enzim besiyeri içeren 500 ml erlenmeyer içerisinde, 37°C, 160 rpm çalkalama hızında büyütülmesi ile elde edilmiştir. Fermentasyon sonunda hücreler santrifüjlenerek (SIGMA 6K15 model santrifüj; 9000g, 45 dak, 0-4 °C) ortamdan uzaklaştırılmış ve kültür üst sıvısı proteaz enziminin aktivitesi III. 2. 4. 2. 2.' de verilen yöntemle belirlenmiştir.

III. 2. 2. Mikroorganizmaların Karakterizasyonu

İzolatların; kültürel (koloni karakterizasyonu, hareketlilik), mikroskopik (morfolojileri: şekil, boyama özelliği, spor oluşturma, büyüklüğü), fizyolojik (aerobik ya da anerobik olarak üreyebilirliği, optimum üreme sıcaklığı) ve biyokimyasal (şekerleri oksidatif ya da fermentatif tarzda kullanabilirliği, metabolizmasını aydınlatmak için çeşitli biyokimyasal testler), genetik karakterleri, Uçar ve diğ., 1998; Nielsen ve diğ., 1995; Şentürk, 1993; Rapp ve Backhaus, 1992; Fritze, 1990; Tamer ve diğ., 1989; Sneath ve diğ., 1986; Nomoto ve diğ., 1984; Gerhardt ve diğ., 1981; Horikoshi, 1971 tarafından tanımlanan testlerle tespit edilmiştir.

III. 2. 2. 1. Kültürel Özellikler

İzolatların kültürel özellikleri; içerikleri Besiyeri 1 ve 2' de içeriği verilen nutrient broth ve alkali nutrient broth ortamlarında aktive edilen izolatlar Besiyeri 9 ve 10' da içeriği verilen nutrient agar ve alkali nutrient agar ortamlarına ayrı ayrı çizgi ve nokta ekim yapılarak belirlenmiştir (Nielsen ve diğ., 1995, Bergey's, 1986).

İzolatların hareketliliği içeriği Besiyeri 20' de verilen yarı katı nutrient agar ortamına steril iğne öze ile aseptik şartlarda dik ekim yapılmıştır. 24 saat boyunca 37 °C' de (izolat 131 ve izolat 132 için 55 °C) inkübe edilen kültürlerde iğne özenin bıraktığı iz üzerindeki üremenin kenarlara dağılımı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

III. 2. 2. 2. Mikroskopik Özellikleri

III. 2. 2. 2. 1. Gram Boyama

İzolatlar içeriği Besiyeri 1' de verilen nutrient broth' ta 24 saat 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C' de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonu tamamlanan kültürlerden bakteriler, steril şartlarda öze ile alınmış ve önceden temizlenmiş lam üzerinde bir damla distile su içerisinde yayılarak kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan bakteriyal film üç kez alevden geçirilerek tesbit edilmiş ve soğumaya bırakılmıştır. Hazırlanan örnekler, filtreden geçirilmiş kristal violet ile mikrobiyal film tabakası kaplanacak şekilde 1-2 dakika etkiye bırakılmıştır. Fazla boya lamdan süzülerek alınmış ve örnekler gram iyodür (Lugol) çözeltisiyle bir dakika etkiye bırakılmıştır. Fazla lugol lamdan süzülerek alınmış, alkolde 6 saniye bekletilmiş ve

suyla yıkayarak alkol uzaklaştırılmıştır. Örnekler safranin ile 30 saniye etkiye bırakılmış, fazla boya lamdan süzülerek alınmış ve suyla yıkanmıştır. Kurutma kağıdıyla hafifçe kurulan örnekler havada iyice kuruduktan sonra bakteri morfolojileri Olympus BH-2 marka araştırma mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Mikroskoptaki Evolution LC color dijital kamera sistemi ile KB-4 filtre kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir. İmage pro-express programı ile bakterilerin boyutları 10X100 lük objektifde immersion yağı kullanılarak ölçülmüştür. İyi boyanmış olan örneklerde Gram (+) olan mikroorganizmalar koyu mor (menekşe) renk, Gram (-) olanlar ise açık pembe renkte görünüm ile ayırd edilmiştir (Tamer, 1989).

III. 2. 2. 2. Endospor Boyama

İzolatlar; içeriği Besiyeri 1' de verilen nutrient broth' ta 24 saat 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C' de inkübe edilmişlerdir. Üreme sonucu pozitif olan kültürlerden Besiyeri 21' de içeriği verilen endospor ortamına steril öze ile çizgi ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyonu tamamlanan kültürlerden bakteriler, steril şartlarda öze ile alınmış ve önceden temizlenmiş lam üzerinde bir damla distile su içerisinde yayılarak kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan bakteriyel film üç kez alevden geçirilerek tespit edilmiştir ve soğumaya bırakılmıştır. Örnekler malaşit yeşili ile alevde 5 dakika etkiye bırakılmıştır ve buharlaştıkça boya ilave edilmiştir. Distile su ile yıkanan örnekler 30 saniye safranin ile boyanmış ve distile suyla tekrar yıkanıp havada kuruttuktan sonra bakteri sporlarının morfolojileri, Olympus BH-2 marka araştırma mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Mikroskopta bulunan Evolution LC color dijital kamera sistemi ile KB-4 filtre kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir. İmage pro-express programı ile bakteri sporlarının boyutları 10X100 lük objektifde immersion yağı kullanılarak ölçülmüştür. Boyama sonucunda; sporlar yeşil, vejetatif hücreler pembeye boyanmış olarak görüntülenmiştir (Tamer ve diğ., 1989).

III. 2. 2. 3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikler

İzolatlar içerisinde alkalen proteaz üreticisi olarak belirlenen 17 izolatın; fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri Nielsen ve diğ., (1995) ve Bergey's (1986) tarafından verilen yöntemlere göre yapılmıştır. Karbonhidrat Fermentasyon Ortamı, Fritze ve diğ., (1990) tarafından verilen yöntemle göre yapılmıştır. Fenotipik karakterizasyonda, Simon sitrat agar, Tripton soya broth, Tripton soya agar besiyerleri de ayrıca kullanılmıştır. Bütün

fenotipik testler üçer defa tekrarlanmıştır. Fenotipik özelliklerin belirlenmesinde kullanılan besiyerleri kısım III. 1. 4.'de, kullanılan metodlar aşağıda, çözeltiler ise Ek A' da verilmiştir.

III. 2. 2. 3. 1. Katalaz Testi

Nutrient Broth' ta 24 saatte aktif hale getirilen izolatlardan nutrient agara çizgi ekim yapılmış ve 24 saat 37°C optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C' de inkübe edilmişlerdir (Bergey's, 1986; Tamer ve diğ., 1989).

Aktivasyon ortamında 24 saat büyütülmüş kültürlerin üzerine %3' lük 1 ml hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi damlatılarak, gaz habbeciklerinin çıkışı gözlenmiştir. Gaz habbeciklerinin çıkışı pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir

III. 2. 2. 3. 2. Oksidaz Testi

Nutrient broth' ta 24 saatte aktif hale getirilen izolatlardan nutrient agara çizgi ekim yapılmıştır. 24 saat 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C' de inkübe edilmişlerdir (Gerhardt ve diğ., 1981).

Oksidaz testi için taze hazırlanan %1'lik tetrametil p-fenilendiamin çözeltisinin birkaç damlasıyla filtre kağıdı nemlendirilmiştir. Platin öze ile (sıradan krom telden yapılmış öze yanlış sonuç verebilir) aktivasyon ortamı yüzeyinden alınan koloni nemlendirilen kağıda sürülmüştür. Koloninin kağıda sürüldüğü kısımda 30 saniye içerisinde mor rengin oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bu test sitokrom oksidaz varlığının belirlenmesinde kullanılmıştır.

III. 2. 2. 3. 3. İndol Üretimi

Yatık olarak hazırlanmış aktivasyon ortamında büyütülen kültürlerden, Tripton broth'a steril öze ile (bir öze dolusu) ekim yapılmış ve bir tüp de inokulasyon yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Tüpler 14 gün boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C' de inkübe edilmişlerdir. 14 gün inkübasyonu yapılan organizmaların üzerine test çözeltisi olarak Kovaks çözeltisi damlatılmıştır. Tüplerin üzerinde oluşan kırmızı renk indol üretimi için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Gerhardt ve diğ., 1981; Tamer ve diğ., 1989).

III. 2. 2. 3. 4. Nitratların Redüksiyonu

24 saatlik yatık olarak hazırlanmış aktivasyon ortamında büyütülen kültürlerden Nitrat broth'a steril öze ile ekim yapılmış ve bir tüp de inokulasyon yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Tüpler 7 gün boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C' de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun 3. ve 7. gününde kültürlerden steril tüplere steril uç ile birer ml alınmıştır, üzerlerine NIT 1 (07341 B Biomerieux, Fransa) ve NIT 2 (07343 B BioMerieux, Fransa) çözeltilerinden damlatılmıştır. Eğer ortamda nitrit mevcutsa, nitrit ile bu iki çözelti karışımı pembemsi-kırmızı bir renk oluşturacağından; bu rengin oluşumu nitrat redüksiyonu için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Ortamda sarımsı-turuncu rengin oluşumu ise NH₃ varlığını göstermiştir. Nitrat brothlar içerisinde bulunan Durham tüplerindeki N₂ gazı oluşumunda ayrıca kontrol edilmiştir (Gerhardt ve diğ., 1981; Tamer ve diğ., 1989).

III. 2. 2. 3. 5. V-P Testi

Nutrient broth ortamında aktive edilen izolatlardan VP brotha steril uç ile 100 µl inokulasyon yapılmış ve 7 gün boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C' de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun 3., 5. ve 7. günlerinde üreme pozitif olanlarda ayrı ayrı ortam pH' sı özel pH metre ile ölçülmüştür. pH farklılıkları dikkate alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir (Bergey's, 1986).

III. 2. 2. 3. 6. Lizozim Testi

24 saatlik nutrient broth aktivasyon ortamında büyütülen kültürlerden, içeriği Besiyeri 7' de verilen lizozim ortamına steril uç ile inokulasyon yapılmış ve bir tüp de inokulasyon yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Kültürler 14 gün boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C' de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun 7. ve 14. gününde üreme olan tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bergey's, 1986).

III. 2. 2. 3. 7. Şeker Kullanım Testleri

24 saatlik nutrient broth aktivasyon ortamında büyütülen kültürlerden, içeriği Besiyeri 10' da verilen karbonhidrat fermentasyon ortamına 4 farklı şeker için farklı tüplere steril uç ile 10 µl inokulasyon yapılmış ve bir tüp de inokulasyon yapılmadan

kontrol olarak kullanılmıştır. Kùltùrler 14 gùn boyunca 37 °C sıcaklıkta inkùbasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C’ de inkùbe edilmişlerdir.

Ortam rengi, 7. ve 14. gùnlük inkùbasyonlarda, Brom Timol Mavi’ sinin alkalın pH’ daki mavi renginden, asidik pH’ daki sarı renge dònmesi pozitif sonuç olarak değerdendirilmiştir.

III. 2. 2. 3. 8. Dihidroksi Aseton Üretimi

Dihidroksi aseton üretiminin belirlenmesi için nutrient broth’ ta aktive edilen izolatlar, gliserol agara inokule edilmiş ve 10 gùn boyunca 37 °C sıcaklıkta inkùbasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C’ de inkùbe edilmişlerdir. 10 gùnlük inkùbasyon sonucunda üremenin varlığı pozitif sonuç olarak değerdendirilmiştir (Bergey’s, 1986).

III. 2. 2. 3. 9. Sitrat Testi

Yatık olarak hazırlanmış aktivasyon ortamında büyütülen kùltùrlerden, sitrat ortamına steril öze ile bir öze dolusu çizgi ekim yapılmış ve sitratlı bir Petri kutusu da inokulasyon yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Kùltùrler 14 gùn boyunca 37 °C sıcaklıkta inkùbasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C’ de inkùbe edilmişlerdir. Sitrat testi için 14 gùnlük inkùbasyon sonunda üreme pozitif sonuç olarak değerdendirilmiştir (Bergey’s, 1986).

III. 2. 2. 3. 10. Simmon’un Sitrat Testi

Yatık olarak hazırlanmış aktivasyon ortamında büyütülen kùltùrlerden, Simmon’un sitrat testi reaktiflerini içeren tüplere steril öze ile bir öze dolusu inokulasyon yapılmış ve bir tüp de inokulasyon yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Kùltùrler 48 saat boyunca 37 °C sıcaklıkta inkùbasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C’ de inkùbe edilmişlerdir. 24 ve 48 saatlik inkùbasyonlar sonunda kùltùrler kontrol edilmiştir. Sitratın kullanılması sonucu oluşan, NaOH’ in besiyerinin renginin yeşilden maviye

döndürmesi, sitrat testi için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (American Public Healt Association, 1984).

III. 2. 2. 3. 11. Fenil Alanin Deaminasyonunun Belirlenmesi

24 saatlik nutrient broth aktivasyon ortamında büyütülen kültürlerden, Petri kutusunda felin alanin içeren yatık olarak hazırlanmış agara steril öze ile bir öze dolusu inokulasyon yapılmış ve bir Petri kutusu da inokulasyon yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Kültürler 7 gün boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 için 55°C’ de inkübe edilmişlerdir.

7 günlük inkübasyondan sonra % 10’ luk FeCl₃’ ün 4-5 damlası, yatık agarlarda ki büyümenin üzerine damlatılmıştır. Büyümenin altındaki yeşil renk oluşumu bu test için pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Bu renk değişimi fenil pürivik asitten, fenil alanin oluşumunu göstermektedir (Gerhardt ve diğ., 1981; Bergey’s, 1986).

III. 2. 2. 3. 12. Tirozin Testi

24 saatlik nutrient broth aktivasyon ortamında büyütülen kültürlerden, Petri kutularından tirozin içeren yatık olarak hazırlanmış agara steril öze ile bir öze dolusu inokulasyon yapılmış ve bir Petri kutusu da inokulasyon yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Kültürler 7 gün boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C’ de inkübe edilmişlerdir. 7 günlük inkübasyondan sonra tirozin kristallerini kullanarak bu ortam üzerinde açık transparan zonlar oluşturan izolatlarda sonuç pozitif olarak kabul edilmiştir (Bergey’s, 1986).

III. 2. 2. 3. 13. DNaz Agar Testi

24 saatlik yatık nutrient agar aktivasyon ortamında büyütülen kültürlerden, Petri kutularında yatık olarak hazırlanmış DNaz agara nokta ekimle inokulasyon yapılmış ve bir Petri kutusu da inokulasyon yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Kültürler 48 saat 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C’ de inkübe edilmişlerdir. Süre sonunda üreme pozitif olan tüplere 1 M HCl dökülmüştür. Koloni etrafındaki açık zon pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve diğ., 1989).

III. 2. 2. 3. 14. Üreaz Testi

24 saatlik nutrient broth aktivasyon ortamında büyütülen kültürlerden, üre agarlı Petri kutularına steril öze ile bir öze dolusu çizgi ekimle inokulasyon yapılmış ve bir Petri kutusu da inokulasyon yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Kültürler 7 gün boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C’ de inkübe edilmişlerdir. 7 günlük inkübasyondan sonra ortam içindeki fenol kırmızısı (pH: 6.8-8.4) indikatörünün renk değişimi izlenmiştir. Fenol kırmızısı indikatörü pH 6.8’ da sarı (asit ortamda) renklidir. İzolatlar üreaz enzimine sahipse NH₃ açığa çıkmasından dolayı

rengi

İnkübasyon Sıcaklığı	İnkübasyon Süresi
----------------------	-------------------

indikatörün
kırmızıya

döner. Fenol kırmızısı indikatörü pH 8.4’ da kırmızı (bazik ortamda) renklidir. Bu durum pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve diğ., 1989).

III. 2. 2. 3. 15. %2, %5, %7, %10 NaCl’ de Büyüme

24 saatlik nutrient broth aktivasyon ortamında büyütülen kültürlerden, %2, %5, %7, %10 NaCl’ lü agar içeren Petri kutularına steril öze ile bir öze dolusu çizgi ekimle inokulasyon yapılmış ve bir Petri kutusu da inokulasyon yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Kültürler 48 saat boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C’ de inkübe edilmişlerdir. 48 saatlik inkübasyondan sonra büyümenin varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve diğ., 1989; Şentürk, 1993).

III. 2. 2. 3. 16. Maksimum ve Minimum Sıcaklıklarda Büyüme

24 saatlik nutrient broth aktivasyon ortamında büyütülen kültürlerden, nutrient agarlı Petri kutularına steril öze ile bir öze dolusu çizgi ekimle inokulasyon yapılmış ve bir Petri kutusu da inokulasyon yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Kültürler Tablo III.1.’ de belirtilen sürelerde farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. Agarda büyümenin varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Bergey’s, 1986).

Tablo III.1 . Sıcaklığa Bağlı Olarak Değişen İnkübasyon Süreleri

5 °C	21 gün
20 °C	21 gün
30 °C	5 gün
40 °C	5 gün
50 °C	5 gün
55 °C	3 gün
65 °C	3 gün

III. 2. 2. 3. 17. NaCl – KCl’ de Büyüme

24 saatlik nutrient broth aktivasyon ortamında büyütülen kültürlerden, içeriği besiyeri 23’ de verilen ortam içeren Petri kutularına steril öze ile bir öze dolusu çizgi ekimle inokulasyon yapılmış ve bir Petri kutusu da inokulasyon yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Kültürler 48 saat boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İzolat 131 ve izolat 132 ise 55°C’ de inkübe edilmişlerdir. Büyümenin varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca üretim sıvı ortamda da tekrarlanmıştır (Bergey’s, 1986).

III. 2. 2. 3. 18. pH 5.7’ de Büyüme

131 ve 132 nolu izolatlar dışındaki izolatlar yatık olarak hazırlanmış aktivasyon ortamında, 37 °C sıcaklıkta, izolat 131 ve izolat 132 ise 55°C’ de inkübe edilmişlerdir. 24-48 saat inkübe edilen kültürlerden Saboraud Dextroz Agara ve brotha ekim yapılmış ve 2 hafta boyunca inkübe edilmiştir. Büyümenin varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Bergey’s, 1986).

III. 2. 2. 3. 19. Büyüme için pH Aralığı Testi

131 ve 132 nolu izolatlar dışındaki izolatlar yatık olarak hazırlanmış aktivasyon ortamında, 37 °C sıcaklıkta, izolat 131 ve izolat 132 ise 55°C’ de inkübe edilmişlerdir. 24-48 saat inkübe edilen kültürlerden farklı tamponlar kullanılarak hazırlanan nutrient agara steril öze ile bir öze dolusu çizgi ekimle inokulasyon yapılmıştır. 1-5 günlük

inkübasyondan sonra büyümenin varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Nielsen ve diğ., 1995).

III. 2. 2. 3. 1. Karbohidrat Kullanım Profillerinin Belirlenmesi –

API 50 CH Testleri

API 50 CH galerisi (Biomérieux) karbohidrat kullanım testleri için kullanılmıştır. Sadece in vitro tanılamada kullanılan API 50 CH şeritleri, aynı zamanda mikroorganizmalardaki karbohidrat metabolizması hakkında bilgi verir. 50 tane farklı karbohidrat türevi içeren şeritler, mikroorganizmaların karbohidrat metabolizmasının asimilasyon veya oksidasyon çalışmaları ile asimilatif, oksidatif ya da fermentatif olduğunun belirlenmesinde kullanılmaktadır. API şeritlerinde ilk küpül substrat içermez ve negatif kontrol olarak kullanılır. API şeritlerinin kompozisyonu Tablo III. 2' de verilmiştir. API şeritlerindeki her bir küpül içerisinde bir miktar dehidre halde bulunan substrat, farklı karbohidrat türevleridir. Bu substratlar, değişik biyokimyasal yollarla metabolize edilirler;

Asimilasyon; sadece karbohidrat kaynağı yani substrat olan küpül içerisinde, bir mikroorganizmanın büyümesiyle gösterilmektedir.

Oksidasyon; küpül içerisinde renk değişikliği ile gözlenmektedir (Küpül içerisindeki renk değişikliği, asiti için pH indikatörü içeren, aerobik üretim ile sağlanmaktadır).

Fermentasyon; küpül içerisinde renk değişikliği ile gösterilmektedir (Küpül içerisindeki renk değişikliği, asiti için pH indikatörü içeren, anaerobik üretim ile sağlanmaktadır).

API 50 CHB/E ortamı.....10 ml

Amonyum sulfat	2g
Maya özütü	0.5 g
Trypton	1 g
Fenol kırmızısı	0.18 g
Mineral karı	10 ml
Fosfat tampon pH:7.8	1000 ml

API seti içerisindeki ampülü dikkatlice kırdıktan sonra 24 saatlik kültürlerden öze ile alınan örnekler çözelti ile vorteks karıştırıcı ılr karıştırılmıştır. Bu örneklerden 1 ml

alınır ve API CHB ampülüne aktarılır, karıştırılıp aseptik koşullarda steril uçlarla API şeritlerine küpül kısmı taşmayacak şekilde seri olarak eklenir. 24 saatlik ve 48 saatlik inkübasyondan sonra her bir küpüldeki renk ilk küpüldeki renk ile karşılaştırılarak karbohidrat kullanımının pozitif ya da negatif olduğu şeklinde değerlendirilir.

Tablo III. 2 . API Şeritlerin Kompozisyonu

Şerit 0-9		Şerit 10-19		Şerit 20-29		Şerit 30-39		Şerit 40-49	
Küpül	Substrat	Küpül	Substrat	Küpül	Substrat	Küpül	Substrat	Küpül	Substrat
0	Kontrol	10	GALactose	20	α -Methyl-D-Mannoside	30	MELibiose	40	D-TURanose
1	GLYcerol	11	GLUcose	21	α -Methyl-D-Glucoside	31	Sucrose	41	D-LYXose
2	ERYthritol	12	FRUctose	22	N-Acetyle Glucosamine	32	TREhalose	42	D-TAGatose
3	D-ARAbinose	13	MaNnosE	23	AMYgdalin	33	INUlin	43	D-FUCose
4	L-ARAbinose	14	SorBosE	24	ARButin	34	MeLeZitose	44	L-FUCose
5	RİBose	15	RHAMnose	25	ESCulin	35	RAFfinose	45	D-ARAbitoL
6	D-XYLose	16	DULcitol	26	SALicin	36	Starch	46	L-ARAbitoL
7	L-XYLose	17	INOsitol	27	CELlobiose	37	GLYcoGen	47	GlucoNaTe
8	ADOnitol	18	MANnitol	28	MALtose	38	XyLiTol	48	2-Keto-Gluconate
9	β -Methyl-D-Xyloside	19	SORbitol	29	LACtose	39	GENTIobiose	49	5-Keto-Gluconate

III. 2. 2. 4. Hücresel Yağ Asitlerinin Analizi

Sherlock-MIDI Otomatik Mikrobiyal Tanılama Sisteminin hazırlamış olduğu protokol kullanılarak (Sherlock Microbial Identification System version 4.0, MIDI Inc., Newark) izolat GMBAE 22 hücresel yağ asidi analizi için hazırlanmıştır.

İzolat GMBAE 22, hücresel yağ asidi analizi için içeriği besiyeri 4' de verilen TSB ortamında 24 saat aktive edilmiştir. 24 saatlik kültürlerden içeriği besiyeri 11' de verilen TSA ortamına steril öze ile çizgi ekimle (Quadrant ekim-dörtlü ekim) inokulasyonu yapılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra steril öze ile TSA' lı ortamda 3. bölgeden 4 mm' lik steril öze ile dikkatli bir şekilde aseptik şartlarda izolat toplanmıştır. Yağ asidi analizi için dört farklı aşama uygulanmıştır.

1. Saponifikasyon: İzolat öze ile steril bir tüpe alınmıştır. Üzerine saponifikasyon çözeltisinden (45 gr NaOH, 150 ml metanol, 150 ml distile su) 1 ml eklenmiştir. Tüpün kapağı kapatılmış ve tüp 5-10 saniye vorteks karıştırıcı ile karıştırılmış ve 5 dakika 100 °C' lik su banyosunda bekletilmiştir. Takiben 5-10 saniye vorteks karıştırıcı ile karıştırılıp 30 dakika 100 °C' lik su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra tüpler soğutulmuştur.

2. Metilasyon: Tüplere metilasyon çözeltisinden (325 ml 6.0 N HCl ile 275 ml metanol karışımı, pH< 1.5) 2 ml eklenmiştir. Tüpün kapağı kapatılıp 5-10 saniye vorteks karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Tüp 80 °C ±1' lik su banyosunda 10 ±1 dakika bekletilmiş daha sonra hızlı bir şekilde soğutulmuştur.

3. Ekstraksiyon: Tüpe ekstraksiyon çözeltisinden (200 ml hekzan ile 200 ml metil-tert-butil-eter karışımı) 1.25 ml eklenmiştir. Tüp 10 dakika yatay durumda karıştırılmıştır. Dikkatlice üst faz bir pipetle ayrılmıştır.

4. Yıkama: Tüpe yıkama çözeltisinden (900 ml distile su içinde çözölmüş 10.8 gr NaOH) 3 ml eklenmiştir. Tüp 5 dakika yatay durumda karıştırılmıştır. Üst fazın üçte ikilik kısmı Gaz Kromatografi vialine transfer edilmiştir.

Yağ asidi analizi için dört aşama tamamlandıktan sonra örnek Gaz Kromatografi cihazına yüklenmiştir. Sonuçlar Ek F' de verilmiştir.

III. 2. 2. 5. Genotipik Özellikler

III. 2. 2. 5. 1. Genomik DNA İzolasyonu

Moleküler tanılama testleri için öncelikle izolatların genomik DNA' ları çıkarılmıştır.

5 ml Alkali Nutrient Broth 37 °C'de çalkalayıcıda 24 saat inkübe edilmiştir. 2.5 ml besiyeri 7000 devir/dakika da 5 dakika santrifüj (Ependorf santrifüj 5417 C) edilmiş ve üst sıvı atılmıştır. 567 µl TE eklenerek hücreler pelet yardımıyla çözülmüş, 30 µl % 10 SDS, 3 µl Proteinaz K (20 mg/ml) eklenmiş ve çok hafif şekilde vorteks karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Sonra 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. 10 000 devir/dakika da 10 saniye santrifüj (short spin) edilmiştir. 100 µl 5 M NaCl eklenerek vorteks karıştırıcı ile karıştırılmıştır. 80 µl CTAB + NaCl (%10 CTAB + 0,7 M NaCl) eklenerek tekrar karıştırılmış ve 65 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir ve 10 000 devir/dakika da 10 saniye santrifüj (short spin) edilmiştir. 750 - 800 µl kloroform/izoamil alkol (24:1) karışımı eklenerek çalkalanmıştır. Daha sonra 13 000 devir/5 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz yeni bir Ependorf tüpüne aktarılarak üzerine 700 µl fenol/kloroform/isoamilalkol karışımı (25:24:1) eklenip karıştırılmasını takiben 13 000 devir/dakika da 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz temiz bir Ependorf tüpüne aktarılarak 340 µl izopropanol ilave edilmiştir. Fibriller görülene kadar kuvvetlice karıştırılarak 13 000 devir/dakika da 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır. Pelet 100 µl % 70 etanol eklenerek yıkanmış, 13 000 devir/dakika da 15 dakika santrifüj edilip üst sıvı atılmış ve pelet Speed- Wak cihazı (RC 10-10T Jouan) ile kurutulmuştur. DNA 50 µl sterilize distile suda çözülmüş ve aynı örnekler tek tüpte toplanmıştır. 10 µl DNA distile su ile 1 ml'ye tamamlanıp, karıştırılmıştır ve 260–280 nm' deki absorbansı ölçülerek konsantrasyonu hesaplanmıştır ($1 A_{260}=50 \mu\text{g}$).

III. 2. 2. 5. 1. 1. Agaroz Jel Hazırlanışı

%0.7' lik jel hazırlamak için; 0.48 gr agaroz (Sigma, A5093) 40 ml 1X TAE agaroz elektroforez tamponuna eklenmiş ve mikro dalga fırında çözülmüştür. Karışımın homojen olması sağlanmış ve yaklaşık 40-45 °C' ye kadar soğutulurken son konsantrasyon 0.3 µg/mL olacak şekilde 10mg/ml' lik etidyum bromürden 3 µl

eklenmiştir. Jel kasete dökülerek 30-60 dakika süre ile donması beklenmiştir. Taraklar çıkarılmış ve jel içinde 1X TAE bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

III. 2. 2. 5. 2. 16 S rRNA geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması

En iyi alkalen proteaz üreticisi olan GMBAE 22 nolu izolattan hazırlanan genomik - DNA örneklerinden agaroz jelde ve spektrofotometrede çıkan sonuçlar değerlendirilmiş ve en iyi örnekler PCR çalışması için kullanılmıştır. Bu testte kullanılan tüm kimyasallar Fermentas (USA) ürünüdür.

PCR koşulları;

10x PCR tampon	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2.0 µl
Primer f27 (25 pmol/µl)	1.0 µl
Primer U1492r (25 pmol/µl)	1.0 µl
Genomik DNA (1/10 dilüsyon)	2.0 µl
dNTP (25 mM A, T, G, C)	0.3 µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.5 µl
dH ₂ O	25 µl

Program:

94°C	5 min
35 döngü	94°C 1 dakika
	50°C 1 dakika
	72°C 3 dakika
72°C	10 dakika
4°C	

PCR koşullarında; Primer 1 (f27 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ve Primer 2 (U1492r 5'-ACCTTGTTACGACTT-3') kullanılarak yürütülmüştür. PCR ürünü, 0.5x TBE tamponda, %1' lik agaroz jelde (150 Voltt) yürütülerek elde edilmiştir.

III. 2. 2. 5. 3. 16S rRNA Gen Dizisinin Belirlenmesi

GMBAE 22 nolu izolata ait 16S rRNA dizisinin belirlenmesinde, iki farklı primer [Primer 1 (f27 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ve Primer 2 (U1492r 5'-ACCTTGTTACGACTT-3')] kullanılarak 1483 bp' lik PCR ürünü elde edilmiştir. ABI

310 DNA dizi analizi sisteminde PCR ürünü incelenerek 16S rRNA gen dizisi belirlenmiştir.

III. 2. 2. 5. 3. 1. Filogenetik Ağacın Oluşturulması

Alkalifilik *Bacillus* türleri için birkaç yeni takson çeşitli araştırmacılar tarafından önerilmiştir (Saekei ve diğ., 2002, Yumoto ve diğ. 1998; Fritze 1996; Nielsen ve diğ., 1995). İzolat GMBAE 22'nin filogenetik pozisyonunu belirlemek amacı ile referans alkalifilik *Bacillus* türlerinin 16S rDNA dizileri ile karşılaştırmalı olarak Şekil IV. 7' de verilen filogenetik ağaç oluşturulmuştur. İzolat GMBAE 22'nin alkalifilik *Bacillus clausii* soyları ile benzerliği incelenmiştir.

Benzerlik araştırması (GenBank/EMBL/DDBJ) Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) programı (Altschul ve diğ., 1990) kullanılarak ve referans veritabanları kullanılarak yapılmıştır. 16S rDNA dizisi Clustal Multiple Alignment Program (Clustal W 1.8) (Thompson ve diğ., 1994) kullanılarak dizinler oluşturulmuştur. Filogenetik ağaç Saitou ve Nei' nin, (1987) "neighbour-joining method" kullanılarak Tree-view 32 programında oluşturulmuştur.

III. 2. 2. 5. 3. 2. İzolat GMBAE 22'nin Accession Numarası

İzolat GMBAE 22'nin 16S rRNA dizi datası referans veri tabanlarından NCBI, NLM, NIH ve GenBank'ın veri tabanlarına DQ131908 nükleotid kabul numarasıyla katılmıştır. Sonuç EK I. 2' de verilmiştir. Filogenetik çalışmada kullanılan diğer 16S rRNA dizilerinin Genbank kabul numaraları aşağıda verilmiştir.

B. clausii T, AJ297493; *B. clausii* NR84, AJ297496; *B. clausii* DSM 8716^T, X76440; *B. clausii* SIN84, AJ297498; *B. clausii* SIN, AJ297494; *B. clausii* O/C84, AJ297495; *B. clausii* T84, AJ297497; *B. clausii* N/R, AJ297492; *B. clausii* O/C, AJ297491; *B. clausii* LMG19634, AF329475; *B. clausii* GMBAE 42, AY152839; *Bacillus* sp.O-4, AB043853; *B. clausii* Y-76-C, AB201798; *Bacillus* sp. M18, AY912087; *Bacillus* sp. H167, AB043859; *Bacillus* sp. IC, AB043855; *B. clausii* LMG19610, AF329474; *Bacillus* sp. M19, AY912088; *B. patagoniensis* PAT05, AY258614; *Bacillus* sp. DSM 8714, X76438; *Bacillus* sp. WW3-SN6, AF137020; *Bacillus* sp. NER, AJ507321; *Bacillus* sp. K12-5, AB043850; *Bacillus* sp. DSM 8717,

X76441; *B. ıkait* 27, AJ431332; *B. pseudofirmus* DSM 8715^T, X 76439; *B. arseniciselanituts*, AF064705; *B. alcalophilus* DSM 485^T, X76436; *Bacillus TUT* 1007, AB098576; *B. clausii* XJU-5, AY959330; *B. clausii* XJU-4, AY959329; *B. clausii* XJU-3, AY960116; *B. clausii* za-w-3, AY066000; *F. salipiscarus*, AB194046; *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366^T, Z26923.

III. 2. 3. Alkalen Proteaz Enziminin Üretimi

GMBAE 22 ile alkalen proteaz enzimi üretimi; %1.0 Çözünebilir nişasta, %0.5 maya özütü, %0.5 pepton, %0.1 K₂HPO₄, %0.02 MgSO₄.7H₂O içeren kompleks ortamda gerçekleştirilmiştir. Ortam pH'sı %10 sodyum sesquikarbonat kullanılarak 10.5' a ayarlanmıştır. Alkalen proteaz üretimi GMBAE 22' nin 100 ml ortam içeren 500 ml' lik erlenmeyerler içerisinde, 37°C de ve 160 rpm çalkalama hızında 48 saat büyütülmesi ile elde edilmiştir.

III. 2. 3. 1. Alkalen Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

GMBAE 22 tarafından üretilen alkalen proteaz enzimi hücre dışına salgılanan bir enzim olduğundan, fermentasyon sonunda hücreler santrifüjlenerek (SIGMA 6K15 model santrifüj; 9000g, 45 dak, 0-4 °C) ortamdan uzaklaştırılmış ve kültür üst sıvısı enzim saflaştırması için kullanılmıştır. Üst sıvıda bulunan proteinler, % 80 saturasyonda amonyum sülfat ilavesi ile gece boyu +4 °C' de çöktürülmüştür. Çökelti, 50 mM pH 10.5 Glisin-NaOH tamponunda çözülerek gece boyu aynı tampona karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası ürün DEAE selüloz anyon değiştirici kolona (25 cm x 2.5 cm çap) yüklenerek aynı tamponla 15 ml saat⁻¹ akış hızında elüe edilmiştir.

Kolon elusyon çözeltisi fraksiyon toplayıcıdaki tüplerle toplanmış ve her bir tüpte 280 nm'de optik yoğunluk ölçümü ile protein varlığı ve hammersten kazein kullanılarak enzim aktivitesi varlığı aranmıştır. Alkalen proteaz aktivitesi kroma- tografi kolonundan ayrılan ilk protein pikinde görülmüştür.

III. 2. 3. 2. Alkalen Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

III. 2. 3. 2. 1. Alkalen Proteaz Enziminin Moleküler Ağırlığının

Belirlenmesi

Enzimin moleköl ağırlığı sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile belirlenmiştir.

Jelin hazırlanması:

Ayırma Jeli (%12w/v)

1- Distile su	1.6 ml
2- %30 akrilamid mix	2.0 ml
3- 1,5 M Tris (pH:8.8)	1.3 ml
4- %10 SDS	0.05 ml
5- %10 Amonyum persülfat	0.05 ml
6- N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin (TEMED)	0.002 ml

Kimyasallar sırası ile cam bir beherde hazırlanmıştır. Toplamı 5 ml olan jel polimerleşme başlamadan önce çok fazla zaman harcamadan hazırlanan kasete dökülmüştür. Jelin üst kısmı izopropil alkol ile düzgünleştirilmiştir ve 20-30 dakika içerisinde jelin donması beklenmiştir. Aynı jel 0.05 gr süt tozu içerecek şekilde tekrar hazırlanmış ve bu jel zimogram için kullanılmıştır. Jeller işaretlenmiş, donduktan sonra üzerlerindeki alkol, distile su ile yıkanarak alınmıştır.

Örnek Yükleme (stacking) jelinin (%5 w/v) hazırlanması:

1- Distile su	3.4 ml
2- %30 akrilamid mix	0.83 ml
3- 1,5 M Tris (pH:6.8)	0.63 ml
4- %10 SDS	0.05 ml
5- %10 Amonyum persülfat	0.05 ml
6- TEMED	0.005 ml

Hazırlanan jel pastör pipeti ile iyice karıştırılmıştır. Jel kasetin üst kısmına döküldükten sonra hemen tarak yerleştirilmiştir. 20 dakika üst jelin donması beklenmiştir.

Örneklerin hazırlanması:

10 µl 5X denatürasyon (craking) çözeltisi (50 mM Tris-HCl pH:6,8, %1 SDS, 2mM EDTA, %1 Beta merkapt etanol, %10 Gliserol %0.02 Bromfenol mavisi) ile 40 µl enzim bir Ependorfta karıştırılmıştır. 120 saniye kaynayan suda bekletilerek denatüre edilmiştir.

SDS-PAGE, %5 (w/v) yükleme jeli ve % 12 (w/v) ayırıcı jel kullanılarak Laemmli (1970) tarafından verilen metoda göre 150 V'da, 100 dakika sürede, BioRad Mini Protean marka elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrası, protein bantları, gümüş boyama ile saptanmıştır. Marker olarak, 14.4-116.0 kDa aralığında, yedi protein içeren, Fermentas Protein Molecular Weight Markers SM0431 kullanılmış ve alkalen proteaz enziminin moleküler ağırlığı Image Analyzer System (UVI, BTS-20.M) cihazı kullanılarak saptanmıştır.

Örneklerin Gümüş Boyama ile Boyanması:

Fiksasyon.....	1 ssat
Çözelti 2.....	20 dak
Distile su.....	10 dak
Çözelti 3.....	5 dak
Distile su.....	3X20 saniye
Gümüş çözeltisi.....	45 dak
Distile su.....	5 saniye
Gelişme çözeltisi.....	izler belirene kadar çalkalanmış,
Stop çözeltisi.....	5 saniye
Bekletme çözeltisi.....	+4 °C' de bekletilmiştir.

Gümüş boyama çözeltileri EK A' da Çözelti 18' de verilmiştir.

Jel distile su ile ıslatılmış Watmann kağıdına yerleştirilmiştir. Üzeri gergin film ile kaplanmış ve jel kurutucuda kurutulmuştur.

III. 2. 3. 2. 2. Alkalen Proteaz Aktivitesi Ölçümü

Fermentasyon sırasında ya da sonunda üretim ortamı, +4 °C sıcaklıkta, 6000g'de ve 10 dakika süre ile santrifüjlenerek (Sigma 6K15) hücreler ayrılmış ve elde edilen üst sıvı (süpernatant) enzim aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır. Proteaz aktivitesi Anson yöntemine göre ölçülmüştür (Takami ve diğ. 1989). 0.5 ml enzim 50 mM glisin-NaCl-NaOH tamponunda hazırlanan %0.6' lık Hammarsten kazein çözeltisinin 2.5 ml'si ile karıştırılarak 30°C' de ki su banyosunda 20 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon, ortama 2.5 ml trikloroasetik asit çözeltisi [0.11 M TCA (Sigma T 4885), 0.22 M Na-asetat (Merck 6265843) , 0.33 M asetik asit (Riedel 27225)] ilave edilerek durdurulmuş ve 30 dakika süreyle 30°C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışım süzülerek filtratın 0.5 ml' si üzerine 2.5 ml 0.5 M sodyum karbonat çözeltisi ilave edilmiş ve ayrıca karışıma 2 kat seyreltilmiş 0.5 mL Folin-Ciocalteau (Sigma F-9252) reaktifi ilave edilerek, karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbans değerleri 660 nm'de (BioRad Smart Spec 3000) ölçülmüştür. Enzim aktivitesi standart tirozin grafiği oluşturularak (Ek H) aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/ml/min)} = \frac{(A_{660}/\text{Eğim}) \times \text{Seyreltme faktörü} \times \text{Toplam Hacim (ml)}}{\text{Enzim Hacmi (ml)} \times \text{İnkübasyon Süresi (dakika)}}$$

Enzim Aktivitesi(U/ml/min) =

Enzim Hacmi (ml) X İnkübasyon Süresi (dakika)

Bir birim alkalen proteaz aktivitesi, kazeinin hidrolizi sonunda, 30 °C'de, pH 10.5'da dakikada %0.6 hammarsten kazeinden 1µg tirozin oluşturan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.

III. 2. 3. 2. 1. Tirozin Standart Grafiğinin Hazırlanması

Alkaline proteaz aktivitesi hesaplamasında kullanılacak olan tirozin standart grafiğinin çıkarılması için 50 mM glisin, NaCl, NaOH, tamponunda (pH: 10,5) 0-50 µg/ml tirozin içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonda tirozin içeren her bir çözeltiden 0,5 ml temiz tüplere aktararak üzerine 2.5 ml 0.5 M Na₂ CO₃ ve iki kez seyreltilmiş Folin reaktifi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek Spektrofotometrede (BioRad Smart Spec 3000) 660 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Tirozin miktarına bağlı olarak okunan 660 nm’ de ki absorbanslardan yararlanılarak, tirozin standart grafiği çizilmiştir. Bu eğriden yararlanılarak örneklerdeki alkalın proteaz aktivileri hesaplanmıştır (Takami ve diğ., 1989). Tirozin standart grafiği Ek H’de verilmiştir.

III. 2. 3. 2. 3. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı sığır serum albumininin (BSA) standart olarak kullanıldığı (Ek 2), Coomasie Blue Boyası Bağlama Yöntemi (Spector, T., 1978, Sedmak, J.J.ve Grossberg S.E., 1977) kullanılarak belirlenmiştir.

III. 2. 3. 2. 3. 1. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanması

Protein standart grafiğinin oluşturulması için; 10 mg BSA 10 ml distile suda çözülmüştür. 1 mg/ml BSA çözeltisine 9 ml distile su eklenerek seyreltme yapılmıştır. Konsantrasyonu duyarlılık içinde kalan standartlar (5, 10, 15, 20, 25, 30 µg BSA/ ml olacak şekilde) uygun sulandırma yapılarak hazırlanmıştır. (1 ml örnek üzerine 1 ml Coomasie Blue reaktifi eklendikten sonra karışımın absorbans değeri spektrofotometrede (BioRad Smart Spec 3000) 595 nm’ de ölçülmüştür. Elde edilen verilerden aşağıdaki formül yardımıyla protein miktarı hesaplanmıştır. Protein standart grafiği Ek H’ de verilmiştir.

$$(A_{595}/\text{Eğim}) \times \text{Seyreltme faktörü}$$

$$\text{Protein } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{---}}{1000}$$

III. 2. 3. 2. 4. Alkalen Proteazın Sıcaklık, pH Profilinin ve Hammarsten

Kazein Varlığında Belirlenmesi

GMBAE 22'de izole edilen Alkalen proteaz enziminin sıcaklık profilinin belirlenmesi için, 0.5 ml enzim çözeltisi (235.051 U/mg spesifik aktivite, 0.118 mg/ml protein) 50 mM, pH 10.5 glisin-NaOH tamponunda hazırlanan %0.6 hammarsten kazeinin 2.5 ml'si ile karıştırılarak, 30 ve 70°C aralığında, Ca^{+2} iyonları varlığında ve yokluğunda, 20 dakika süreyle inkübe edilmiştir.

pH profilinin belirlenmesi için, 0.5 ml enzim çözeltisi (235 051 U/mg spesifik aktivite, 0.118 mg/ml protein) pH: 7-7.50 1.0 M Sodyum fosfat tampon, pH 8-8.50 aralığında 1.0 M $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$, pH: 9-12 aralığında hazırlanan 50 mM glisin-NaOH tamponunda ve pH 12.5-13 aralığında 200 mM glisin-NaOH tamponunda hazırlanan, %0.6 hammarsten kazeinin 2.5 ml'si ile karıştırılarak, 30°C'de, 20 dakika inkübe edilmiş ve yukarıda verilen yöntemle aktivite hesaplanmıştır.

III. 2. 3. 2. 5. Sıcaklık ve pH'nın Alkalen Proteaz Kararlılığı Üzerine Etkisi

Sıcaklık ve pH' nın, enzim kararlılığı üzerine etkisini araştırmak için, 0.05 ml enzim solüsyonu (235 051 U/mg spesifik aktivite, 0.118 mg/ml protein) 0.450 ml 50 mM glisin-NaOH tamponunda pH 9.0 ve 12.0, and 200 mM glisin-NaOH tamponunda pH 12.5 ve 13.0' de karıştırılmıştır. Karışım 5 gün oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve kısım III. 2. 3. 2. 2.' de verilen yöntemle göre aktivite hesaplanmıştır.

Enzimin termal kararlılığını belirlemek için, 0.5 ml enzim çözeltisi (235 051 U/mg spesifik aktivite, 0.118 mg/ml protein) 30 ve 65°C sıcaklık aralığında, pH 10.5' de 2 saat inkübe edilmiş ve 2.7' de verilen yöntemle göre aktivite hesaplan mıştır. Enzim stabilitesi ölçümlerinde, farklı pH ve sıcaklık değerlerinde, inkübasyondan önceki aktivite değeri 100 olarak kabul edilip inkübasyondan sonra kalan aktivite yüzde olarak ifade edilmiştir.

III. 3. 2. 5. Fenilmetilsulfonilflorid Varlığında Enzim Aktivitesi

Proteaz enziminin aktif bölgesinde katalizden sorumlu amino asitlerin varlığını belirlemek amacı ile amino asit inhibitörlerinden, serin spesifik fenilmetil sülfonilflorid (PMSF, Sigma P-7626) kullanılmıştır.

Enzim aktivitesi üzerine amino asit inhibitörünün etkisini belirlemek amacı ile 0.05 ml enzim çözeltisi PMSF içeren 0.450 ml reaksiyon çözeltisi ile 30°C’de, 2 saat inkübe edilmiştir. Kalan aktivite, aynı koşullarda inhibitörsüz olarak inkübe edilen kontrol örneği ile karşılaştırılmıştır.

PMSF taze olarak etanolde hazırlanmış ve pH 10.5’da 50 mM NaOH-Glisin-NaCl tampon ile istenen konsantrasyona seyreltilerek kullanılmıştır. İnkübasyon çözeltisinde, etanolün son konsantrasyonu % 2 olacak şekilde hazırlanmıştır. Etanolün bu konsantrasyonunun enzimin inaktivasyonuna neden olmadığı belirlenmiştir.

BÖLÜM IV

SONUÇLAR

IV. 1. Mikroorganizmaların Enzim Profillerinin Belirlenmesi

IV. 1. 1. Katı Besiyerinde Enzim Profillerinin Belirlenmesi

TÜBİTAK-GMBAE, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı tarafından izole edilen 146 mikroorganizma proteaz, amilaz, selüloz ve lipaz enzimleri açısından

taranmıştır. İlk tarama katı besiyerinde yapılmış ve tarama sonuçları Tablo IV.1’ de verilmiştir. Tarama çalışmaları mikroorganizmaların ürettiği optimum pH ve sıcaklık değerlerinde yapılmıştır.

Tarama sonuçlarında zon çapı 5 mm üzerinde olan mikroorganizmalar enzim üreticisi olarak seçilmiştir. Bu doğrultuda 146 mikroorganizma içerisinde 3, 5, 19, 20, 21, 22, 34, 39, 44, 46, 57, 65, 502, 504, 505, 506 ve 507 numaralı izolatlar proteaz üreticisi olarak 131 ve 132 numaralı izolatlar ise amilaz üreticisi olarak seçilmiştir.

Tablo IV.1. Enzim Profilleri

İzolat No	Zon Çapı		Sellülaz	Lipaz
	Amilaz (mm)	Proteaz (mm)		
1	-	6	-	-
2	3	5	-	-
3	-	9	-	-
4	-	8	-	-
5	-	8	-	-
6	-	5	-	-
7	-	1	-	-
10	-	5	-	-
11	-	-	-	-
12	2	5	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	2	-	-	-
17	-	2	-	-
18	-	2	-	+
19	-	8	-	-
20	-	9	-	-
21	-	10	-	-
22	-	9	-	-
23	-	1	-	-
24	3	-	+	+
25	3	-	-	-
26	-	-	-	-
27	3	-	-	-
28	2	8	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	+	-
34	-	10	-	+
35	-	2	-	-
36	-	2	-	-

37	-	-	-	-
38	-	5	-	-
39	-	10	-	-
40	-	2	-	+
41	-	2	-	-
43	-	1	-	-
44	-	15	-	-
46	-	10	-	-
48	3	5	-	-
49	-	3	-	-
50	2	2	+	-
51	6	-	-	-
52	-	3	-	-
53	-	3	-	-
55	-	6	-	-
56	3	6	-	-
57	-	9	-	-
60	-	5	-	-
61	-	-	-	+
62	-	-	-	-
63	-	-	-	-
64	-	4	-	-
65	-	9	+	+
66	-	-	-	-
67	-	-	-	-
69	-	-	-	-
70	-	3	-	-
73	-	-	-	-
74	3	8	-	-
75	-	-	-	+
76	-	-	-	-
77	3	-	-	-
78	2	5	-	-
79	3	-	-	-
81	-	-	-	-
82	-	5	-	-
83	3	5	-	-
84	2	-	-	-
87	-	5	+	-
88	-	3	-	-
89	3	-	-	-
90	2	2	-	+
92	-	3	-	-
93	-	3	-	-
95	-	-	-	-
96	-	-	-	-
97	-	-	-	-
98	2	-	-	-
99	2	-	-	-
100A	-	-	-	-

100B	-	-	-	-
101	-	-	-	-
102	-	-	-	-
103	-	-	-	-
104	-	-	-	-
105	-	-	-	-
106	-	-	-	-
107	-	-	-	+
108	2	-	-	-
109	-	-	-	-
110	-	-	-	-
111	3	-	-	-
113	-	-	-	-
114	-	-	-	-
115	-	-	-	-
116	-	-	-	-
117	-	-	-	-
118	-	-	-	-
119	-	-	-	-
120	-	-	-	-
121	-	-	-	-
122	-	-	-	-
123	-	-	-	-
125	2	-	+	+
126	-	-	-	-
127	-	-	+	-
129	-	-	-	-
131	8	-	-	-
132	8	-	-	-
133	-	-	-	-
134	-	-	-	-
135	-	-	-	-
136	-	-	-	-
137	-	-	-	-
138	-	-	-	-
139	-	-	-	-
140	-	-	-	-
141	-	-	-	-
150	-	-	-	-
151	2	-	-	-
152	-	-	-	-
153	-	-	-	-
154	-	-	-	-
155	-	-	-	-
156	-	-	-	-
157	-	-	-	-
158	-	-	+	-
160	-	-	-	+
161	-	-	-	-
162	-	-	-	-

163	-	-	+	+
164a	-	-	-	-
164b	2	-	-	-
165	-	-	-	-
166	3	-	-	-
167	2	-	+	-
168	-	-	-	-
169	-	-	-	-
502	-	10	-	-
503	-	3	-	-
504	-	30	-	-
505	-	30	-	-
506	-	15	-	-
507	-	12	-	-
508	-	6	+	-
509	2	-	-	-

+, Pozitif, -; Negatif

*Her bir izolat için deney üç kez tekrarlanmış ve ölçüm sonuçları ortalama değerlere göre alınmıştır.

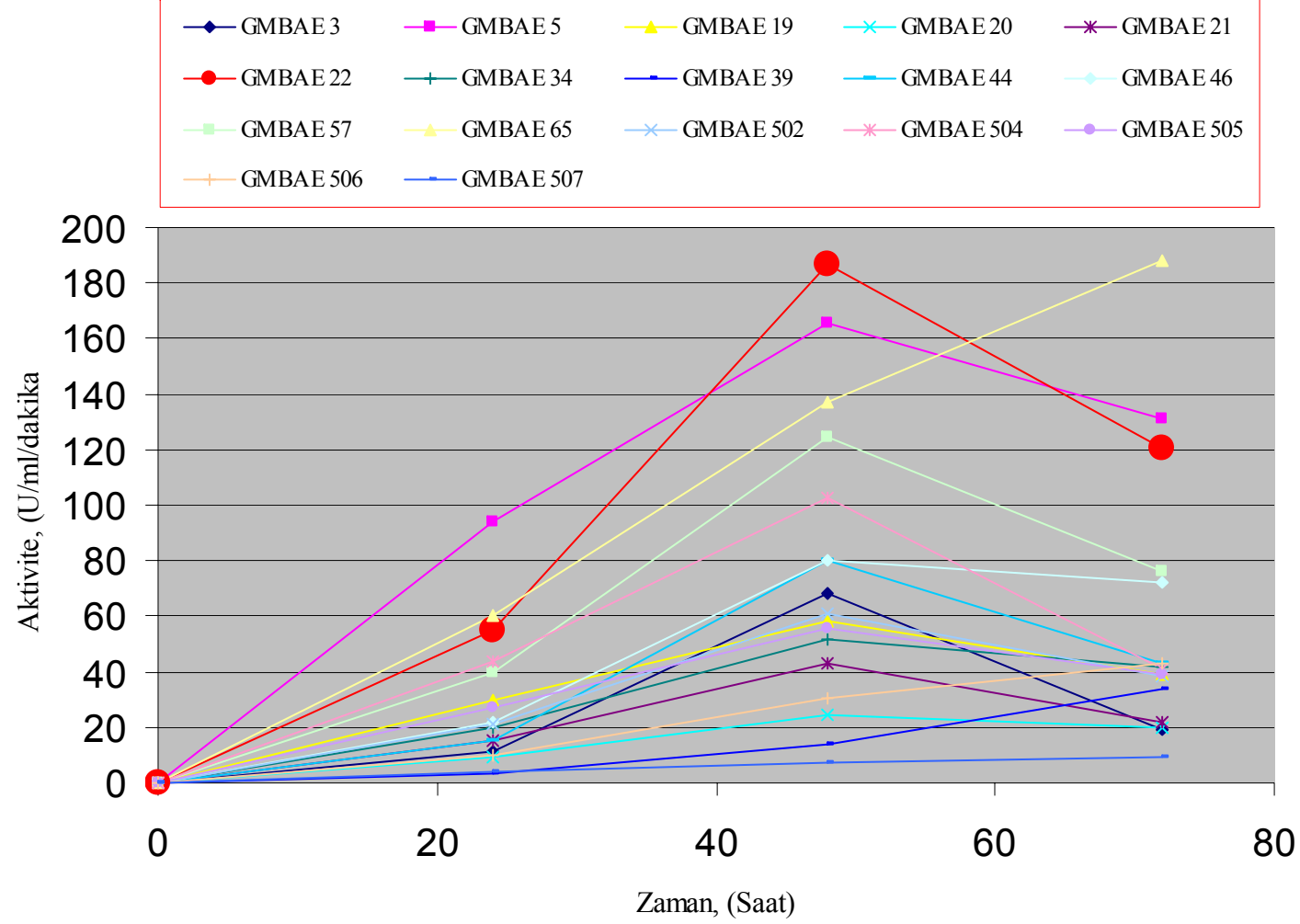
Çalışma kapsamına birinci öncelikli olarak proteaz üreticisi mikroorganizmalar ele alınmıştır. Seçilen 17 izolatın katı proteaz ortamında fotoğrafları çekilmiş ve sonuçlar EK B' de verilmiştir.

IV. 1. 2. Sıvı Besiyerinde Enzim Profillerinin Belirlenmesi

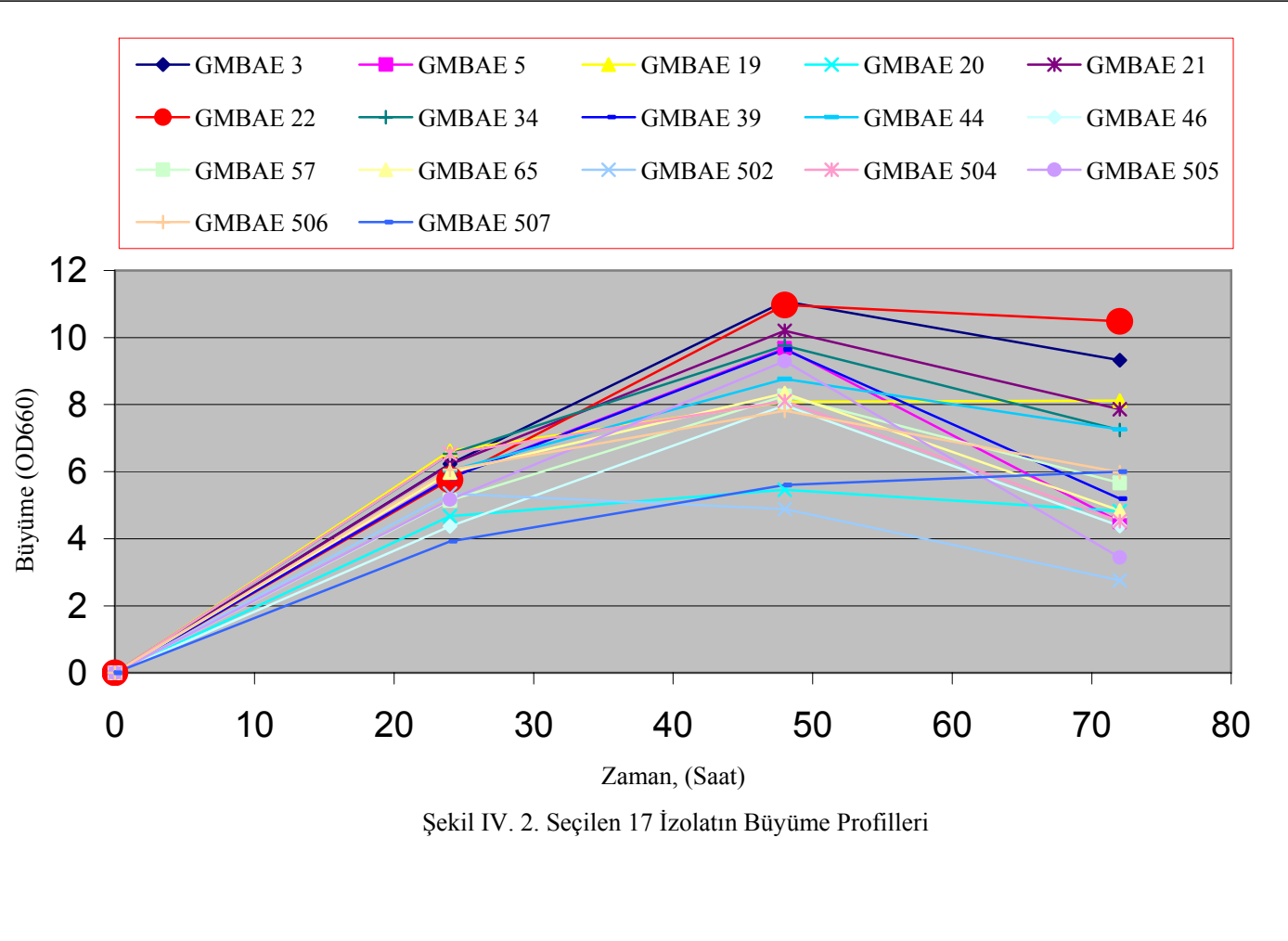
Tez kapsamında öncelikli olarak ele alınan proteaz üreticisi olan 17 izolat 400 ml'lik sıvı proteaz ortamında büyütülerek enzim profilleri belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo IV.2' de, grafikler ise Şekil IV.1-IV.2'de toplu olarak verilmiştir.

Tablo IV.2. Seçilen 17 İzolatın Alkalen Proteaz Aktivitesi

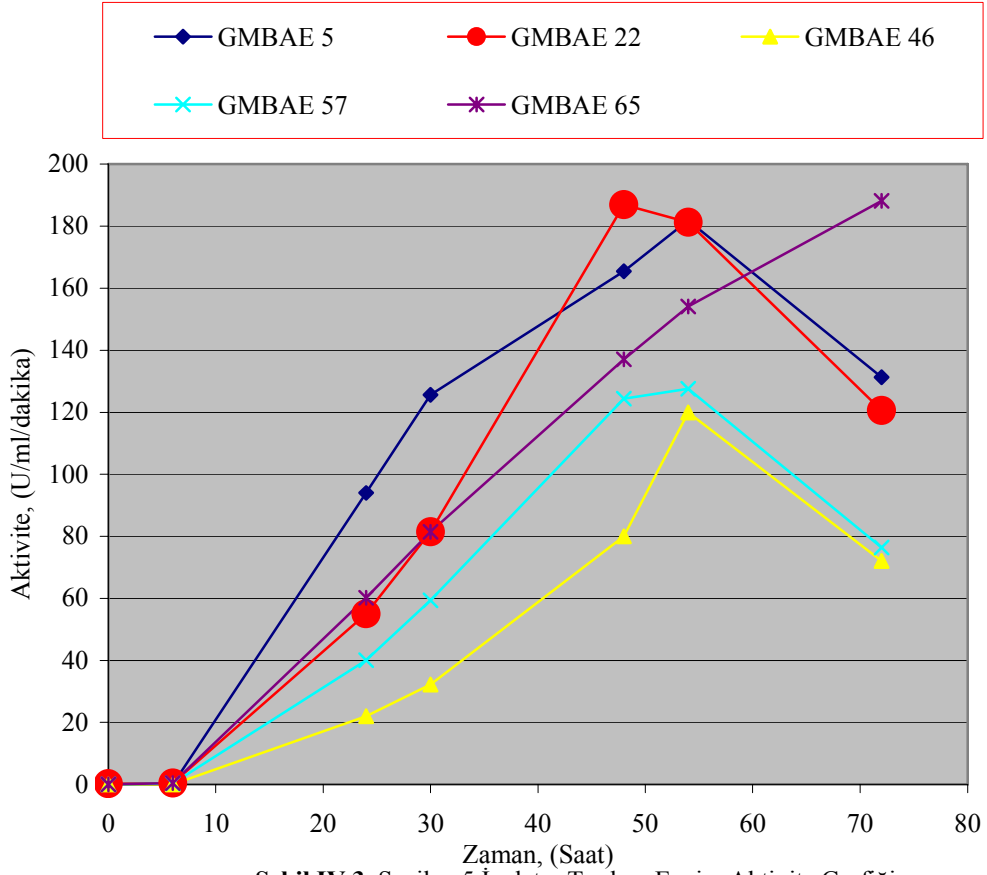
İzolat No	Aktivite (U/ml/dakika)			
	0 saat	24 saat	48 saat	72 saat
3	0	11.08	68.38	19,10
5	0	94.00	165.47	131.36
19	0	30.0	58.06	39.10
20	0	9.29	24.19	20
21	0	14.96	43.22	21.70
22	0	55.00	186.94	120.63
34	0	19.87	51.93	42.0
39	0	3.57	13.89	33.473
44	0	14.93	80.00	42.78
46	0	22.00	80.00	72.00
57	0	40.03	124.42	76.42
65	0	60.15	137.05	188.21
502	0	60.96	60.96	38.60
504	0	43.87	102.32	41.10
505	0	27.47	55.37	39.30
506	0	9.89	30.37	42.94
507	0	4.096	7.096	9.0



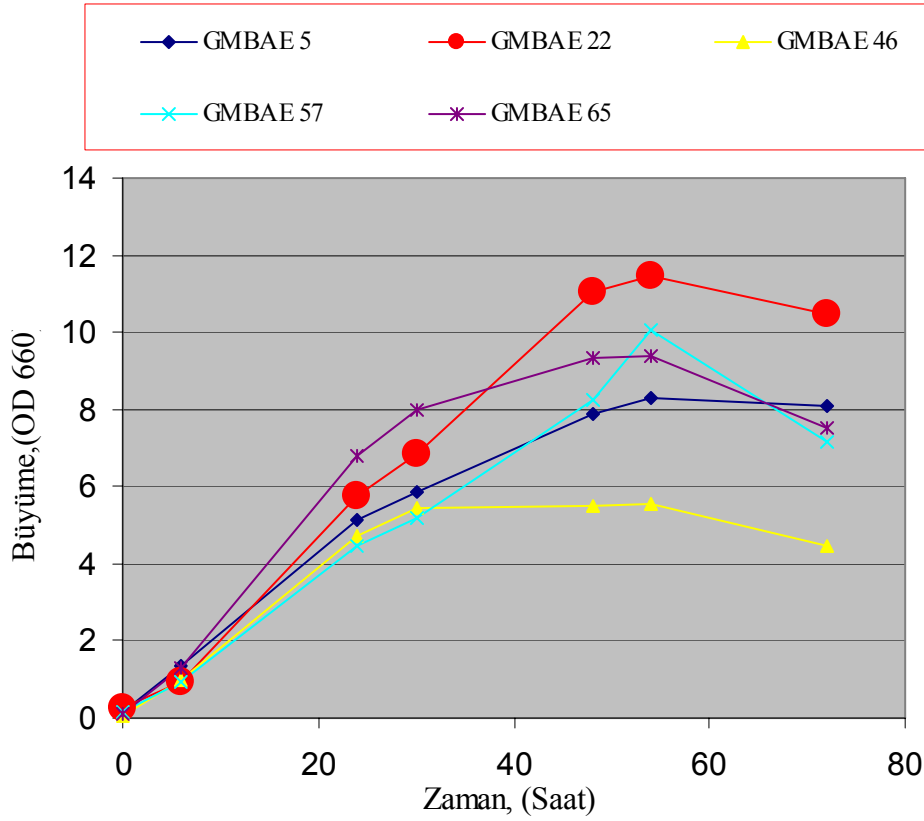
Şekil IV. 1. Seçilen 17 İzolatın Toplam Enzim Aktivite Profili



Seçilen 17 izolatın enzim sonuçları incelenmiş ve 72 saat sonunda alkale proteaz enzim aktivitesi 50 (U/ml/dakika)'nın üzerinde olan 5 izolat (GMBAE 5, GMBAE 22, GMBAE 46, GMBAE 57, GMBAE 65) seçilmiştir. Seçilen bu izolatların 500 ml'lik erlenmayerde 100 ml'lik ortamda enzim aktiviteleri, büyümeleri tekrarlanmış ve sonuçlar şekil IV. 3 ve şekil IV. 4' de toplu olarak verilmiştir.



şekil IV.3. Seçilen 5 İzolatın Toplam Enzim Aktivite Grafiğı



Şekil IV.4. Seçilen 5 İzolatın Büyüme Grafiği

IV. 2. Mikroorganizmaların Karakterizasyonu

17' si alkalen proteaz üreticisi, 2' si amilaz üreticisi seçilen 19 izolatın mikrobiyal karakterizasyonu kısım III. 2. 3.' de verilen metotlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

IV. 2. 1. Kültürel Özellikler

Seçilen izolatlardan, GMBAE 502 nolu izolatın koloni rengi kavuniçi diğer izolatların ise krem olarak belirlenmiştir. Koloni şekillerine bakıldığında izolatlar yuvarlak koloni şekline sahiptir. Seçilen izolatların koloni karakterizasyonu Tablo IV.3' de verilmiştir.

Tablo IV.3. Seçilen İzolatların Koloni Karakterizasyonu

İzolat no	Şekil	Koloni yüksekliği	Kenar şekli	Renk
3	Yuvarlak	Az konveks	Düzgün	Krem
5	Yuvarlak	Düz	Filamentöz	Krem
19	Yuvarlak	Düz	Düzgün	Krem
20	Yuvarlak	Az konveks	Az tırtıklı	Krem
21	Yuvarlak	Düz	Düzgün	Krem
22	Yuvarlak	Düz	Filamentöz	Krem
34	Yuvarlak	Düz	Filamentöz	Krem
39	Yuvarlak	Düz	Düzgün	Krem
44	Yuvarlak	Şişkin	Düzgün	Krem
46	Yuvarlak	Düz	Düzgün	Krem
57	Yuvarlak	Düz	Az tırtıklı	Krem
65	Yuvarlak	Konveks	Düzgün	Krem
502	Yuvarlak	Konveks	Düzgün	Kavuniçi
504	Yuvarlak	Düz	Az tırtıklı	Krem
505	Yuvarlak	Düz	Düzgün	Krem
506	Yuvarlak	Konveks	Düzgün	Krem
507	Yuvarlak	Düz	Az tırtıklı	Krem
131	Yuvarlak	Düz	Düzgün	Krem
132	Yuvarlak	Şişkin	Düzgün	Krem

Seçilen 19 izolatın hareketliliği besiyeri 20' de verilen ortamda incelenmiş ve tümünün hareketli olduğu belirlenmiştir.

IV. 2. 2 . Mikrobik Özellikleri

Seçilen izolatların Gram boyama ve endospor boyama metodları ile hazırlanan preparatlarından ışık mikroskopunda fotoğrafları çekilmiştir. Sonuçlar; EK C' de verilmiştir. Seçilen izolatların ışık mikroskopunda yapılan ölçüm sonuçları Tablo IV. 4' de verilmiştir.

Tablo IV.4. Seçilen İzolatların Işık Mikroskobunda Yapılan Ölçüm Sonuçları

İzolat no	Bakterinin boyu (µm)	Bakterinin eni (µm)	Sporun boyu (µm)	Sporun eni (µm)	Sporun konumu	Sporun şekli
3	2.697	0.857	1.108	0.774	S/T	E
5	2.269	0.839	1.258	0.863	S/T	Y
19	2.242	0.765	0.727	0.736	S/T	E
20	6.802	0.879	1.197	0.785	S/T	E
21	2.400	0.751	0.915	0.573	S/T	E
22	2.675	0.728	1.096	0.655	S/T	E
34	2.956	1.033	0.995	0.716	C	Y
39	3.731	0.717	1.286	0.808	C	Y
44	2.093	0.883	0.887	0.765	C	E
46	2.569	0.925	1.261	0.869	S/T	E
57	2.71	0.98	1.065	0.853	S/T	E
65	3.714	1.157	1.198	0.812	S/T	E
502	3.604	1.228	0.997	0.931	S/T	E
504	3.212	0.986	0.875	0.615	S/T	E
505	2.645	0.958	1.437	0.952	S/T	E
506	3.096	1.238	1.211	0.634	C	E
507	3.008	0.993	0.992	0.633	S/T	E
131	3.195	0.897	1.035	0.790	S/T	E
132	3.316	1.048	0.73	0.610	S/T	E

* S/T: Subterminal , E: Elips şeklinde, C: Central, Y: Yuvarlak

Her bir ölçüm 30 ölçümün aritmetik ortalamasıdır.

Işık mikroskobunda yapılan inceleme sonucunda seçilen izolatların Gram pozitif ve morfolojik olarak çubuk şekilli olduğu belirlenmiştir.

IV. 2. 3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Seçilen izolatların fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan Nutrient agar, Tripton Soya Agar, Üre agar fotoğrafları EK D' de verilmiştir. Seçilen izolatların fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri tablo haline getirilmiştir. Sonuçlar, Tablo IV. 5.' de verilmiştir. Fenotipik özelliklerin belirlenmesinde API hazır tanı kitleri kullanılarak deneyler tekrarlanmıştır. API 50 CH karbonhidrat asimilasyon testinin sonuçları Tablo IV. 6' da, 48 saatlik test fotoğrafları ise Ek E' de verilmiştir.

Tablo IV. 5. Seçilen 19 İzolatın Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Özellikler	İzolatlar																		
	3	5	19	20	21	22	34	39	44	46	57	65	502	504	505	506	507	131	132
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat redüksiyonu	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+		
VP Test	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
pH in VP Broth < 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH in VP Broth >7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lizim’ de Büyüme	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Asit Oluşumu																			
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Xylose	+	+	z	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-Mannitol	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukozdan Gaz Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dihidroksiaseton oluşumu	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Sitrat Kullanımı	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Simon Sitrat Kullanımı	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Fenilalanin deaminasyonu	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tirozin Degradasyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNaz	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Üre	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
NaCl’ lü ortamda Büyüme																			
%2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
%5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
%7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
% 10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Sıcaklıklarda Büyüme																			
30 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
40 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
50 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
55 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
65 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

NaCl and KCl ihtiyacı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH : 5.7' de Büyüme	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
pH : 6' da Büyüme	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH : 7' de Büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH : 8' de Büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
pH : 9' de Büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
PH: 10'da Büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Oksijensiz Büyüme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo IV. 6. Karbonhidrat Asimilasyon Testinin Sonuçları (API 50 CH testleri)

Sıra no	Test	İzolat no																*Tip türler									
		3	5	19	20	21	22	34	39	44	46	57	65	504	505	506	507	B. clausii DSM 8716	B.pseudofirmu s DSM8715	B.agaradhaere ns DSM 8721	B.clarkii DSM 8720	B.halodurans DSM 497	B.halmapalus DSM 8723	B.horikoshii DSM 8719	B.pseudocalo philus DSM 8725	B.alcalophilus DSM 485	B.gibsonii DSM 8722
1	Gliserol	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2	Eritritol	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	D-Arabinoz	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	L-Arabinoz	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
5	Riboz	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
6	D-Ksiloz	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
7	L-Ksiloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Adonitol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	β-Metil-D-Ksilosid	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
10	Galaktoz	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
11	Glukoz	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Fruktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	Mannoz	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
14	Sorboz	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
15	Rhamnoz	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
16	Dulstol	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
18	Mannitol	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Sorbitol	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	α-Metil-D-Mannosid	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	α-Metil-D-Glukoside	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
22	N-Acetil Glukosamine	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
23	Amgdalin	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
24	Arbutin	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

25	Eskulin	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+									
26	Salicin	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+		+		+		-	+		+
27	Sellobiyoz	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	Maltoz	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	Laktoz	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-			+	-	-	+	+	+
30	Melibiyoz	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+		+	-	-	-	+	+
31	Sukroz	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	Trehaloz	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	Inulin	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
34	Melezitoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-			+	-	-	-		+
35	Raffinoz	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+			-	-	-	+	
36	Nişasta	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+		+		+	+	+	+	-
37	Glikojen	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+		+		+	+	+	+	+	-
38	Ksilitol	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+		-		+	-	-	-	-	-
39	Gentiobiyoz	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+							+	+	+
40	D-Turanoz	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+		+					+	+	+
41	D-Liksoz	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		+			-	-			-
42	D-Tagatoz	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+		-	-	-			-
43	D-Fukoz	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	L-Fukoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-					-	-	-		-
46	L-Arabitol	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Glukonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-		+				-	-
48	2-Keto-Glukonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		+						-	
49	5-Keto-Glukonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Nielsen ve diğ., 1995; Fritze ve diğ., 1990

IV. 2. 4. İzolat GMB AE 22'nin Kemotaksonomik Özellikleri

İzolat GMB AE 22 ve referans soy *Bacillus clausii* DSM 8716^T arasındaki taksonomik benzerlik hücre sel yağ asitlerinin analizi ile saptanmıştır. Her iki soy için hücre sel yağ asitleri kompozisyonu ve toplam yağ asitlerine oranı Tablo IV.7.' de verilmiştir. Doymuş iki yağ asidi C_{10:0} ve C_{11:0} (iso 3OH) hariç her iki soy arasında profiller arası benzerlik bulunmuştur. Her iki izolatta da iso-C 15 ve anteiso C 15 ana yağ asitleri olarak görülmektedir.

Tablo IV. 7. İzolat GMB AE 22 ve *Bacillus clausii* DSM 8716^T yağ asidi profili

Yağ Asidi	% Toplam Yağ Asidi,	
	GMB AE 22	<i>Bacillus clausii</i> DSM 8716 ^T
10:0	0.51	0.29
11:0 iso 3OH	2.22	-
iso-C 14:0	1.14	1.70
14:0	1.61	0.60
iso-C 15:0	46.04	38.81
anteiso-C 15:0	12.36	17.76
16:1 ω7c alkol	7.19	3.32
iso-C 16:0	3.21	2.24
16:1 ω1 Ic	0.87	2.72
C 16:0	5.09	2.06
İso 17:1 ω10c	2.23	1.94
iso-C 17:0	6.67	16.35
anteiso-C 17:0	2.09	9.95

Yapılan biyokimyasal test sonuçları, Nielsen ve çalışma arkadaşlarının alkalifilik *Bacillus* genusu üzerine yaptıkları çalışma ile karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlar 16S rRNA sonuçları ile birleştirildiğinde izolat 22 *Bacillus clausii* olarak tanımlanmış ve *Bacillus clausii* GMB AE 22 adı ile NCIB (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası'ndan DQ131908 kabul numarası alınmıştır.

IV. 2. 5. Genotipik Özellikler

IV. 2. 5. 1. Genomik-DNA izolasyonu

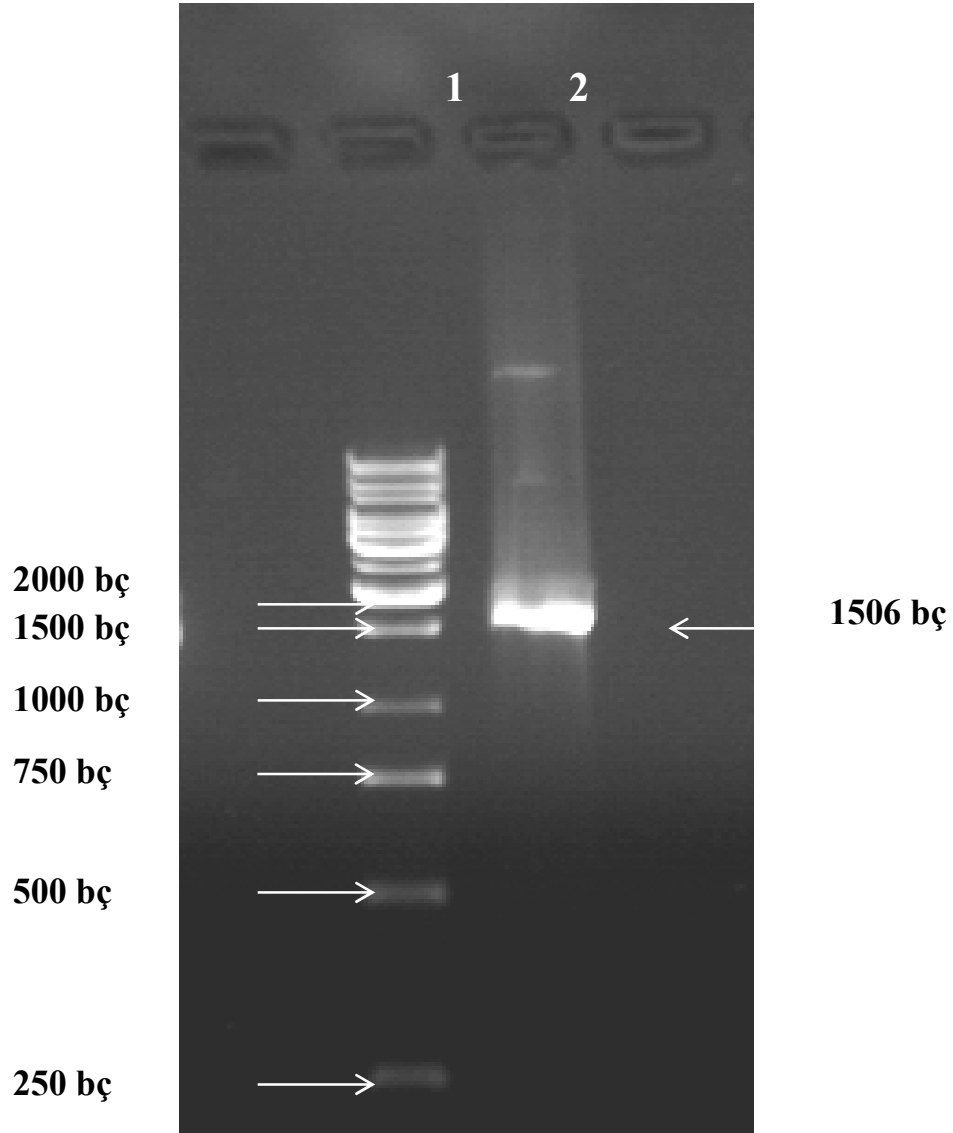
Genomik DNA protokolüne göre hazırlanmış olan g-DNA' lar %0.7' lik agaroz jelde kontrol edilmiş ve jel fotoğrafı (UVI, BTS 20M) çekilmiştir.



Şekil IV. 5. GMBAE 22 nolu izolata
ait %0.7'lik jelde genomik-DNA

IV. 2. 5. 2. 16 S rRNA geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması

İzolat 22' den elde edilen 16S rRNA geninin elektroforez fotoğrafı şekil IV. 6.' da verilmiştir. Dizi analizine alınan gen 1483 baz çiftini içermektedir.



Şekil IV. 6. 1: 1kb DNA Marker (Fermentas, USA)
(Aralık 14 parça : 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250.
2: PCR ürünü

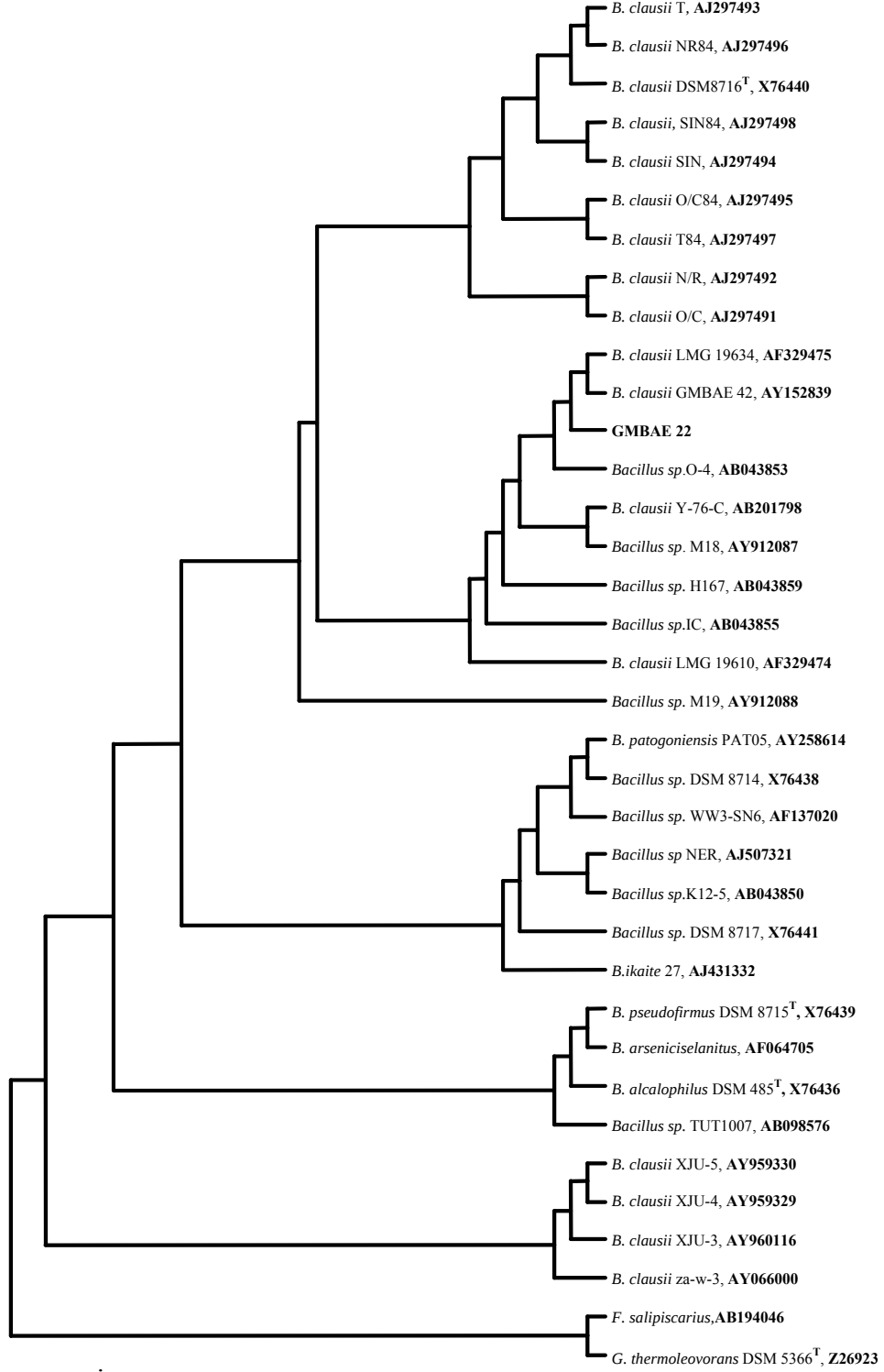
IV. 2. 5. 3. 16S rRNA Dizisinin Belirlenmesi

GMBAE 22 nolu izolata ait 16S rRNA dizisi iki farklı primer [Primer 1 (f27 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ve Primer 2 (U1492r 5'-ACCTTGT TACGACTT-3')] kullanılarak belirlenmiştir. 16S rRNA dizisi (1483 bp' lik PCR ürünü) aşağıda verilmiştir. İzolat GMBAE 22'nin alkalifilik *Bacillus clausii* soyları ile birlikte %99 benzerlik gösterdiği ve aynı küme içinde bulunduğu belirlenmiştir.

5'- GCGTCCTATACATGCAAGTCGAGCGGACATTATAAGGAGCTTGCTCC
TTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCCCTTA
GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCCTTTCTCC
ACCTGGAGAGAGGGTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTAAGGGATGGGCCC
GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCG
TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGT
TGTGAGGGAAGAAGCGGTACCGTTCGAATAGGGCGGTNCCTTGACGGTACC
TCACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTT
CTTAAGTCTGATGTGAAATCTCGGGGCTCAACCCCGAGCGGCCATTGGAAA
CTGGGGAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTC
TGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGCGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATG
CCCGTAGTGCCNAANTTAACACATTAAGCACTCCCCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAG
CATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
TTTGACCACCCAAGAGATTGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTG
GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGNACTCTAAGGT
GANTGCNNGGTGACAAACNNGAGGAAGNTGGGGATGACGTNAANTNATNAT
NNCCTNTATGACNTGGGCTACACACGTGTTNCAATGGATGNTNCAAAGGGC
AGCGAAACCGNGAGGTGAAGCCAATNCCATAAAGCCATTNTCAGTTCGGAT
TGCAGGCTGCAACTCGCTTGTCATGAANCTGGAATTCATAGTAATCGTGGATC
AGCATGNTNGCGGTGAATATGTTCCCGGGTCTTGTACACACNGCCGNGTCAC
ACCATCGAGAGTTTGTAACACCCGAATGTCGGTGAGGCAACCTTTTGGACCC
AGCCGTCATAAGGNGGGACAANNGACATGGGGTGANGTCTACNAAGNTTCN
CG-3'

IV. 2. 5. 3. 1. Filogenetik Ağacın Oluşturulması

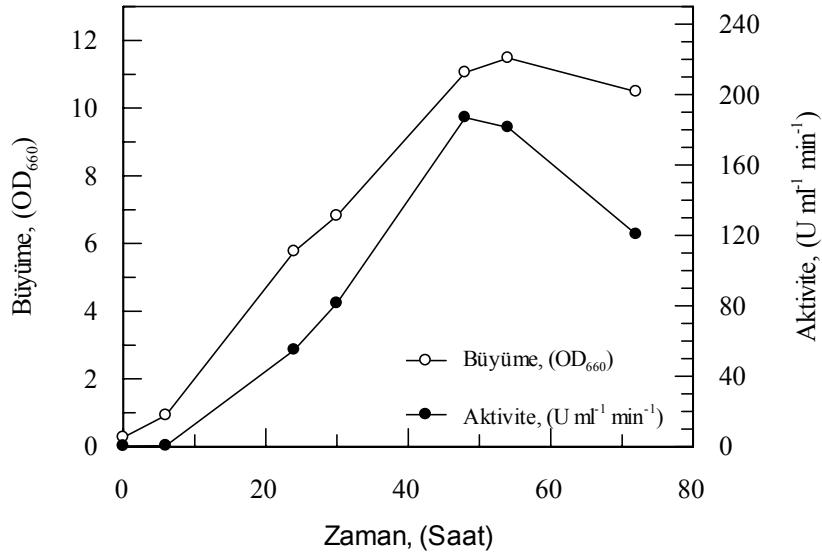
Filogenetik ağaç Saitou ve Nei' nin, (1987) “neighbour-joining method” kullanılarak Tree-view 32 programında oluşturulmuştur.



Şekil IV. 7. İzolat GMBAE 22'nin Filogenetik Ağacı

IV. 3. Alkalen Proteaz Enziminin Üretimi

GMBAE 22 izolatının alkalen proteaz üretimi bakteriyal üremenin lag fazdan sonra 10 uncu saate doğru başladığı belirlenmiştir. Enzim üretimi üstel olarak hücresel büyümesi ile birlikte artmış, kùltivasyonun 48 inci saatine doğru maksimum düzeye ulaşmıştır.



Şekil IV.8. 100 ml' lik ortamda izolat GMBAE 22' in zamana bağlı büyüme ve alkalen proteaz üretimi grafiğı

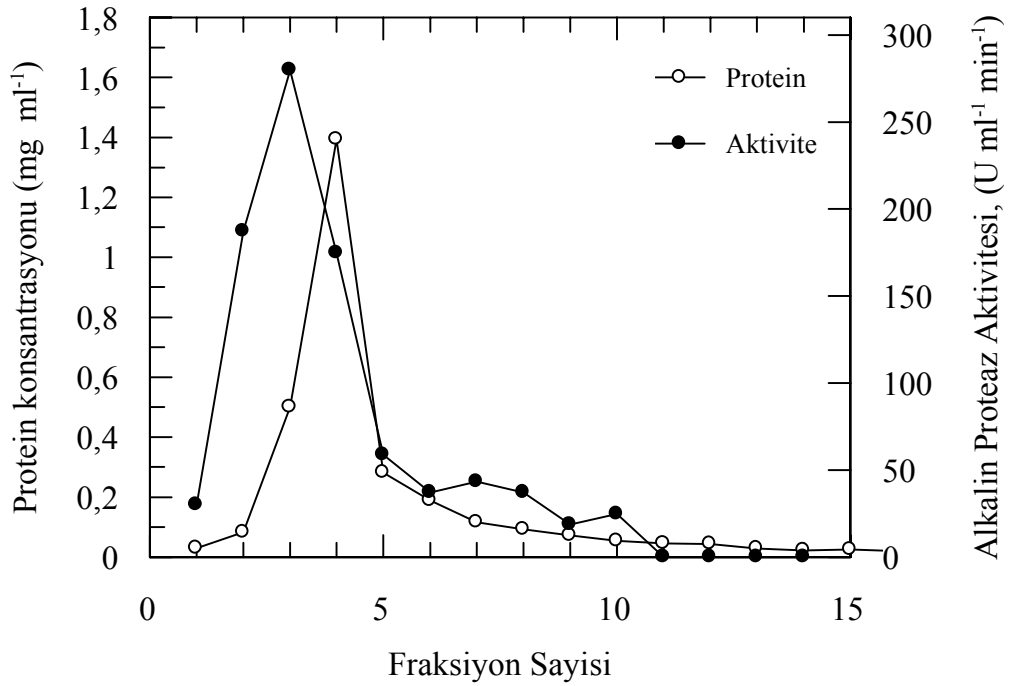
IV. 3. 1. Alkalen Proteaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Kısım III. 2. 6.' da verilen üretim ortamında büyütölen izolat GMBAE 22' nin ürettiğı hücre dışı enzimin laboratuvar ölçeğinde saflaştırılması için bir süreç geliştirilmiştir. Bu süreç; (NH₄)₂SO₄ ile çöktürme ve iyon değıştirme (DEAE selölöz) kromatografisini adımlarını içermektedir. Geliştirilen saflaştırma prosesiyle elde edilen saflaştırma profili Tablo IV.8' de verilmiştir.

DEAE selölöz kolon kromatografisi ile elde edilen ayırma profili Şekil IV. 11' de verilmiştir. Kromatografi sonrası toplanan fraksiyonlarda elde edilen spesifik aktivite 2941.30 Umğ⁻¹ olarak bulunmuştur. Saflaştırma sonucunda ulaşılan verim %14.69' dır.

Tablo IV.8. GMBAE 22 nolu İzolatın Ürettiği Alkalen Proteazının Saflaştırılma Profili.

Adım	Hacim (ml)	Total Protein (mg)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U mg ⁻¹)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Fermentasyon sıvısı	1800	144	159 210	1105.62	100	1
% 80 Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz sonrası elde edilen örnek	56.5	73.45	52 072	1708.94	32.70	1.55
DEAE-selüloz kolonunun birleştirilmiş fraksiyonları	27	7.96	23 401	2941.30	14.69	2.66



Şekil IV. 9. DEAE-Selüloz kolon kromatografisi

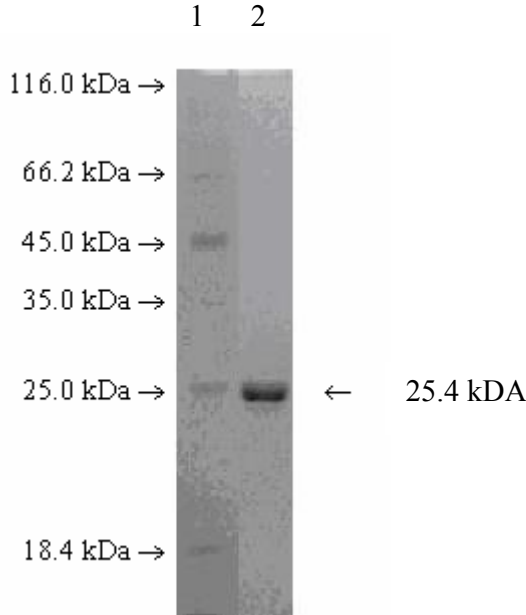
IV. 3. 2. Alkalen Proteaz Enziminin Karakterizasyonu

IV. 3. 2. 1. Alkalen Proteaz Enziminin Moleküler Ağırlığının

Belirlenmesi ve Peptid Kütle Haritası

GMBAE 22' den saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile belirlenmiş ve protein moleküler ağırlığının 25.4 kDa ağırlığında olduğunu bulunmuştur. (Şekil IV.10).

DEAE selüloz kolon çıktısından alınan örnek tek başına SDS-PAGE için jelle yüklendiğinde boyama sonunda hiçbir band gözlenmemiştir. Bu örnek PMSF ile birlikte kaynatıldıktan sonra jelle yüklendiğinde elektroforez sonunda boyama ile protein bandı gözlenmiştir.



Şekil IV.10. Alkalen proteaz enziminin pH:8,3 Tris-glisin tamponunda 150 volt'luk gerilim altında %12' lik jelde SDS-PAGE elektroforezi. Kolon 1; Protein standartlarının moleküler ağırlıkları, Kolon 2; Alkalen proteaz kolon eluatı (PMSF varlığında).

Peptid kütle analizleri, Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya mühendisliği Bölümü' nde Q-ToF-Micro (Waters/Micromass) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Bacillus clausii* GMBAE 22' den SDS-PEGE ile saflaştırılan ve Coomassie boyama ile görünür hale getirilen alkalen proteaz enzimine ait bant (Şekil IV.10) jelden kesilerek alınmış ve triptik parçalama yapılmıştır. Elde edilen peptid kütleleri MASCOT programı kullanılarak, NCBI'nin data bazına (comprehensive nonredundant protein sequence data base) karşı taranmıştır. Elde edilen sonuçlardan, peptid kütlelerinin subtilisin savinase (aksesyon no: 267048) ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Score 91). Yapılan taramada 19 peptid kütle değerinden 17 sinin databazı ile eşleştirildiği görülmüştür. Tarama sonuçları doğrultusunda, SDS-PAGE' de elde edilen bantın alkalen proteaz enzimine ait bant olduğu belirlenmiştir.

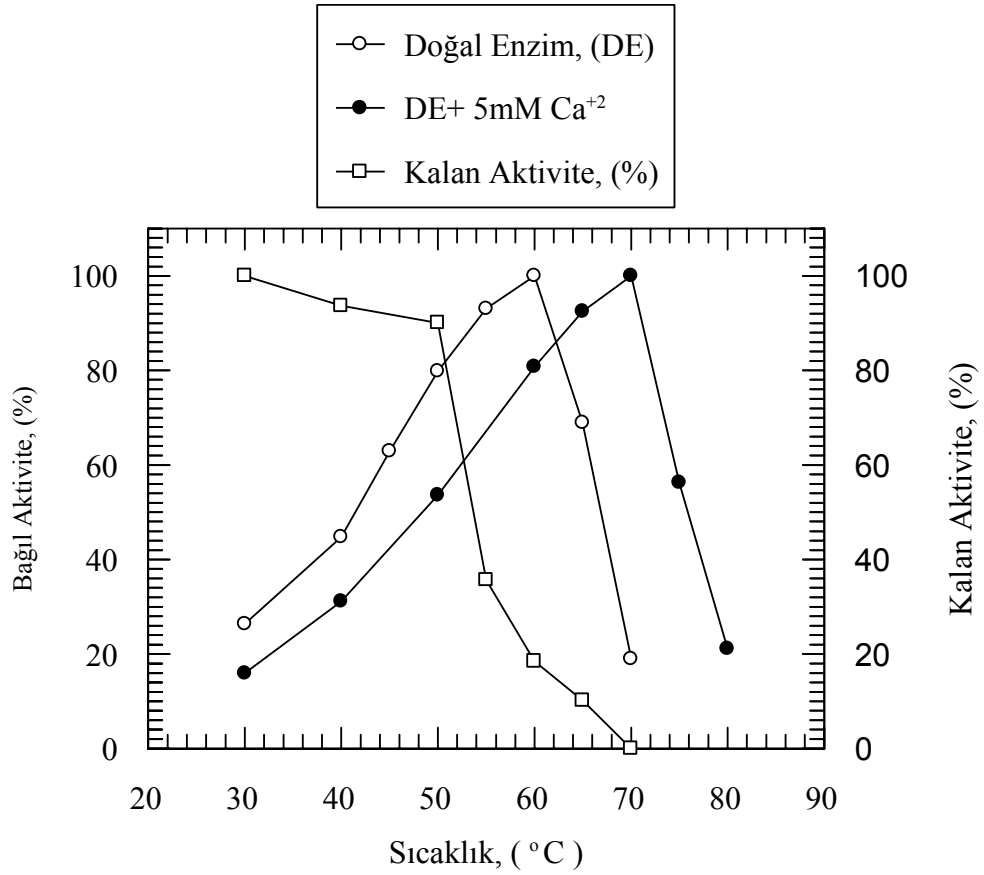
IV. 3. 2. 2. Sıcaklığın Proteaz Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine

Etkisi

Sıcaklığın GMBAE 22 nolu izolattan elde edilen ve kısmi olarak saflaştırılan alkalen proteaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi amacı ile 30 ve 70°C sıcaklıklar arasında 5 mM Ca^{+2} iyonu varlığında ve yokluğunda alkalen proteaz aktivitesi belirlenmiştir (Şekil IV. 13.). Optimal sıcaklıkta ifade edilen en yüksek sıcaklıkta aktivite değeri 100 kabul edilmiş diğer sıcaklıklardaki aktiviteler buna oranlanarak % bağıl aktivite olarak verilmiştir.

GMBAE 22 nolu izolattan elde edilen ve kısmi olarak saflaştırılan alkalen proteaz enzimine ait optimum sıcaklık değeri 60 °C olarak belirlenmiştir. Ca^{+2} iyonu varlığında ise optimum sıcaklık değeri 70 °C' ye yükselmiştir.

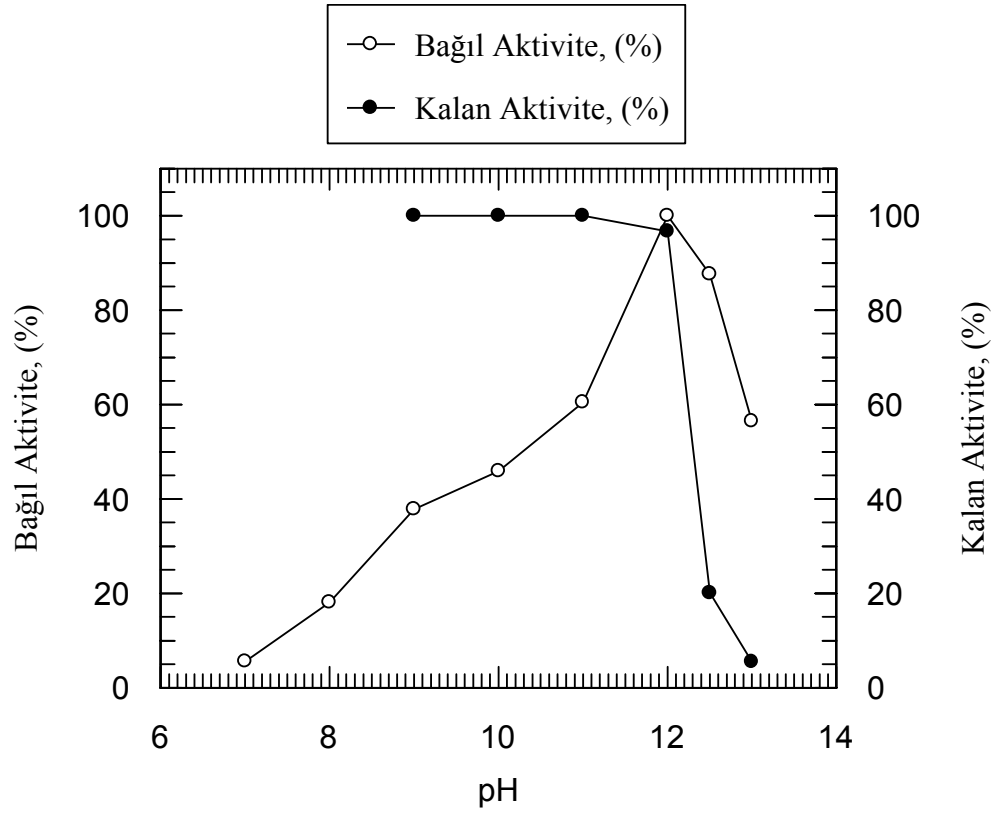
Termal kararlılık ifade edilirken 30°C' de ki 2 saatlik inkübasyon sonucu aktivite kaybı olmadığından 100 olarak kabul edilmiş diğer sıcaklıklardaki inkübasyonlar sonucunda ölçülen aktivitelerin buna oranı kalan aktivite olarak verilmiştir. Enzimin, pH 10.5' da 30°C' de 3 saat kararlı olduğu, aynı sürede 40°C' de enzim aktivitesinin %6.35' ini kaybettiği ve 50°C' de ise enzim aktivitesinin %9.96' sını kaybettiği, belirlenmiştir.



Şekil IV. 11. Sıcaklığın proteolitik aktivite ve stabilite üzerine etkisi

IV. 3. 2. 3. Proteolitik Aktivite Üzerine pH'nın Etkisi

Deterjan alkalin proteazlarının seçimi için önemli olan etkenlerden biri enzimin yüksek pH'larda aktivitesini korumasıdır. *Bacillus clausii* GMB AE 22' den elde edilen alkalin serin proteaz enzimi için aktivite aralığı pH 7.0 den pH 13 e kadar geniş bir aralıkta incelenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi pH 12.0 de saptanmıştır. Enzim pH 9.0 ve 11 değerleri arasında 30 °C' de 24 saat süre ile inkübe edildiğinde hiç bir aktivite kaybının olmadığı saptanmıştır (Şekil IV. 14.). Enzim pH 12.0' da %96.70 ve pH 12.5' de aynı koşullarda inkübe edildiğinde %20.14 oranında aktivitesini korumaktadır.

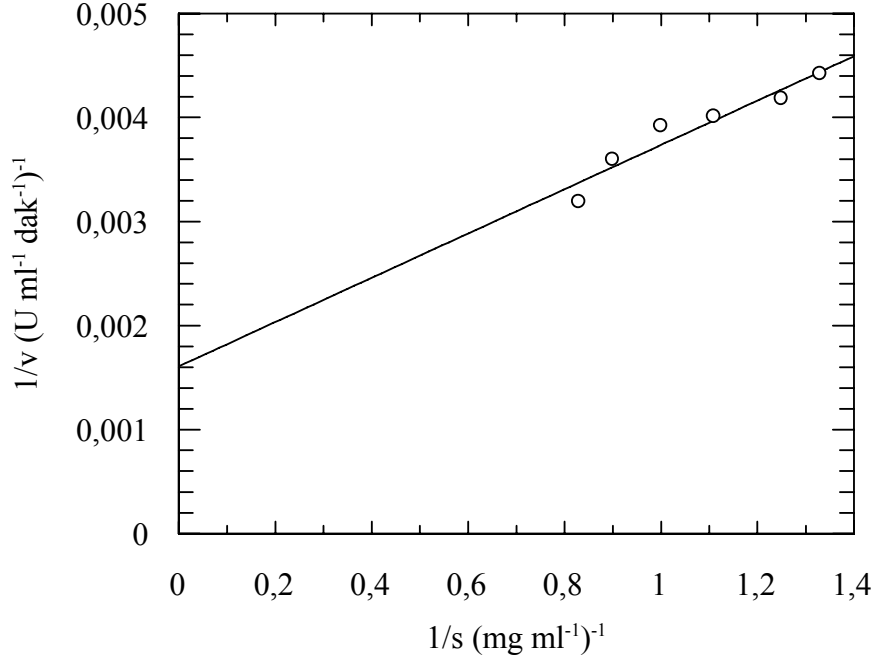


Şekil IV. 12. pH'nın proteolitik aktivite ve stabilite üzerine etkisi

IV. 3. 2. 4. Michaelis Menten Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

GMBAE 22' den elde edilen alkalin proteaz enziminin K_m ve V_m değerleri Lineveawer-Burk grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Lineveawer -Burk diyagramı Şekil IV. 35.' de verilmiştir.

Michaelis Menten kinetik sabitleri (K_m , V_m ve k_{cat}), hesaplanmış ve sonuçlar Tablo IV. 9.' da verilmiştir.



Şekil IV. 13. GMBAE 22'den elde edilen alkalen proteaz enziminin Lineveawer -Burk diyagramı

Tablo IV. 9. GMBAE 22.den elde edilen alkalen proteaz enziminin Hammersten kazein hidrolizine ait Michaelis-Menten kinetik parametreleri

Substrat	K_m (mg ml ⁻¹)	V_m (µmol tirosin ml ⁻¹ dak ⁻¹)	k_{cat} (dak ⁻¹)	K_{cat} / K_m (dak ⁻¹ / mg ml ⁻¹)
Hammersten kazein	1.32	621.11	469.51	355.68

IV. 3. 2. 5. Fenil metil sulfonil florür Varlığında Enzim Aktivitesi

GMBAE 22' den elde edilen alkalen proteaz enziminin katalitik bölgesinde katalizden sorumlu amino asitlerin belirlenmesi amacı ile standart deneme koşullarında 2 saat süre ile amino asit inhibitörlerinden fenilmetilsülfonilflorür (PMSF) ile inkübe edilmiştir. PMSF serin ile özgün reaksiyon veren bir inhibitördür. 1 mM PMSF varlığında, enzim aktivitesinin %100 oranında kaybolduğu belirlenmiştir. Bu bulgu enzimin aktif bölgesindeki katalizden sorumlu amino asitin serin olduğunu ve dolayısıyla enzimin bir serin proteaz olduğunu göstermektedir.

BÖLÜM V

TARTIŞMA, DEĞERLENDİRME ve ÖNERİLER

V. 1. TARTIŞMA

V. 1. 1. Mikroorganizmaların Enzim Profillerinin Belirlenmesi

Enzimler, tekstil, deri, gıda, deterjan sanayinde ve çevre uygulamalarında her geçen gün artan bir oranda kullanılmaktadır. Ekstrem koşullarda aktivite gösterebilen enzimlere yukarıda belirtilen endüstri kollarının büyük gereksinimi vardır. Özellikle alkalen koşullarda yüksek aktiviteye ve kararlılığa sahip proteaz enzimine deterjan endüstrisi tarafından gereksinim duyulmaktadır ve dünya enzim pazarının % 60' ını proteaz enzimi oluşturmaktadır. Bu nedenle çalışma kapsamında TÜBİTAK-GMBAE, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı tarafından yüksek sıcaklıktaki su kaynaklarından ve komposttan izole edilmiş 146 mikroorganizma başta alkalen proteaz olmak üzere, amilaz, selüloz ve lipaz enzimleri açısından taranmıştır. Tablo IV-1' de görüldüğü gibi izolatlar içerisinde %80.3' ü proteaz, %45,26' sı amilaz, %16.06' sı da selüloz ve lipaz üretmektedir. Yapılan enzim taramaları sonucunda en iyi amilaz üreticilerinin 131 ve 132 numaralı izolatlar olduğu bulunmuştur. Proteaz üreticileri arasında 17 adet izolat en iyi olarak belirlenmiştir. Seçilen 17 izolat, alkalen proteaz aktivitesi açısından (3, 5, 19, 20, 21, 22, 34, 39, 44, 46, 57, 65, 502, 504, 505, 506 ve

507) sıvı alkalen proteaz üretim ortamında büyütülerek tekrar taranmıştır. İzolatlar alkalen proteaz üretim ortamında 72 saat büyütülmüş ve 24 saat aralıklarda ortamdaki alkalen proteaz varlığı ve mikroorganizmaların büyümeleri belirlenmiştir (Tablo IV-3, Şekil IV-1 ve Şekil IV-2). 17 izolat içinden sıvı besiyerinde 50 U/ml/dak ve üstünde enzim aktivitesi elde edilen izolatlar daha ileri aşamaya alınmıştır. Bu doğrultuda 5, 22, 46, 57 ve 65 numaralı izolatların diğer izolatlara göre daha yüksek alkalen proteaz ürettiği belirlenmiştir. Bir ileri aşamada, seçilen 5 izolat 100 ml'lik besiyerinde 72 saat büyütülerek alkalen proteaz üretimleri karşılaştırılmıştır (Tablo IV-4) 5 izolat içerisinde 22 numaralı izolattan 48 saatlik fermentasyon sonunda en yüksek miktarda (187 U/ml/dak) enzim aktivitesi elde edilmiştir. 65 numaralı izolat da aynı miktarda (188 U/ml/dak) enzim üretmesine rağmen bu değere 72 saat sonucunda ulaşmıştır. 22 numaralı izolat daha kısa sürede en yüksek alkalen proteaz enzim aktivitesine ulaştığı için, 22 numaralı izolat tez kapsamında ileri tanımlama ve enzim karakterizasyonu çalışmalarına alınmıştır.

V. 1. 2. Kültürel, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikler

Literatürde, alkalifilik (pH 9 ve üzerinde büyüeyebilen) ve alkalitolerant (pH 7 ve üzerindeki pH' larda büyüeyebilen) *Bacillus* türlerinin sınıflandırılması ile ilgili yoğun çalışmalar bulunmaktadır. Bu bakteriler, filogenetik olarak farklı olan *B. alcalophilus* ve *B. cohnii* hariç, daha önce tanımlanan *Bacillus* türlerinden 11 farklı fenotür ve 13 farklı genotür içinde sınıflandırılmışlardır (Fritze ve diğ., 1990; Nielsen ve diğ., 1994; Nielsen ve diğ., 1995). Bununla birlikte, özellikle *Bacillus clausii* türünü içeren grupta tanımlanan, fenotipik karakterler arasında heterojenite olduğu gösterilmiş, (Nielsen ve diğ., 1995) alkalifilik suşların tür düzeyinde tanımlanmasında zorluklar oluşturduğu belirtilmiştir (Senesi ve diğ., 2001).

İzolat GMBAE 22'nin fenotipik özellikleri ve karbohidrat kullanım profili Tablo V. 1 ve 2' de referans soy *Bacillus clausii* DSM 8716^T (Nielsen ve diğ., 1995) ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. İzolat GMBAE 22, Gram pozitif, aerobik, katalaz pozitif, oksidaz negatif, hareketli, subterminal konumlu ellipsoid spor oluşturan, çubuk şekilli (ortalama 2.675-0.728 çapında, endosporu ise 1.096-0.655 çapında ölçülmüştür) bir bakteridir. GMBAE 22, pH 5.7-10 aralığında, % 2-10 NaCl varlığında pH 7 de büyüme yeteneğindedir. Bu sonuca göre GMBAE 22 nolu izolat alkalotolerant bir mikroorganizmadır. Organizma 30-40°C sıcaklık aralığında büyüeyebilir ve optimum büyüme sıcaklığı 37°C olarak bulunmuştur. 50°C ve 55°C'de büyüme gözlenmemiştir.

İzolat GMBAE 22 ve referans soy *Bacillus clausii* DSM 8716^T ile yapılan karşılaştırmalı 30 testin 25' inde benzer sonuçlar bulunmuştur (Tablo V. 1.). 49 karbonhidrat kullanım testinden 38 unun sonuçları da benzer olarak saptanmıştır (Tablo V. 2.). Glycerol, L-arabinoz, sorboz, maltoz, melibioz, melezitoz, raffinoz, glikojen, D-liksoz, D-arabitol and α -metil-D-mannozid kullanımlarında GMBAE 22 ve referans soy *Bacillus clausii* DSM 8716^T arasında farklılık belirlenmiştir. Sonuçta numerik olarak iki mikroorganizma % 80 (79 testten 63' ü) benzerlik göstermektedir.

Tablo V. 1. İzolat GMBAE 22'nin fenotipik özellikleri

Şekil	Çubuk	Çubuk
Koloni Formu	Yuvarlak	
Elevasyon	Düz	
Koloni Marjini	Filamentöz	
Koloni Rengi	Krem	
Hareketlilik	+	+
Spore	+ (subterminal)	+ (subterminal -parasentral)
Gram Reaksiyon	+	+
Katalaz	+	+ (†)
Oksidaz	-	+ (†)
NO ₃ → NO ₂	-	+
5 °C	-	-
30 °C	+	+
40 °C	+	+
50 °C	-	+
55 °C	-	-
pH 5,7	+	
pH 6	+	-(†)
pH 7	+	+
pH 8	+	+
pH 9	+	+
pH 10	+	+ (†)
pH 11		+ (†)
pH 12		- (†)
pH 12,5		- (†)
% 2 NaCl	+	+
% 5 NaCl	+	+
% 7 NaCl	+	+
% 10 NaCl	+	+
	+	
pH VP broth<7	-	
	+	+
Jelatin	+	+
	+	+
	-	
Arginin hidrolaz		- (†)
Lizin hidrolaz		- (†)
Üreaz	-	- (†)
	-	-
	+	-
İndol Üretimi	-	- (†)
	-	- (†)
Lizozim varlığında büyüme	-	- (†)

* Nielsen ve ark. (1995); (†)Sonuçlar tarafımızdan elde edilmiştir (2004).

Tablo V. 2. İzolat GMBAE 22 ve referans soy *Bacillus clausii* DSM 8716^T'nin

karbonhidrat kullanım profili.

Gliserol	-	+	(1)
Eritritol	+	-	(2)
D Arabinoz	-	-	(2)
L Arabinoz	-	+	(1)
Riboz	+	+	(1)
D Ksiloz	+	+	(2)
L Ksiloz	-	-	(1)
Adonitol	-	-	(1)
β Metil-D-Ksilozid	-	-	(2)
Galaktoz	+	+	(2)
Glukoz	+	+	(1)
Fruktoz	+	+	(1)
Mannoz	+	+	(1)
Sorboz	+	-	(2)
Ramnoz	+	+	(1)
Dulsitol	+	+	(1)
Inositol	+	+	(2)
Mannitol	+	+	(2)
Sorbitol	+	+	(1)
α-Metil-D-Mannozid	-	+	(2)
α-Metil-D-Glukozid	+	+	(1)
N-Asetil Glukozamin	+	+	(1)
Amigdalın	+	+	(1)
Arbutin	+	+	(2)
Eskulin	+	+	(2)
Salisin	+	+	(1)
Sellobioz	+	+	(1)
Maltoz	-	+	(1)
Laktoz	-	-	(2)
Melibioz	-	+	(1)
Sakkaroz	+	+	(1)
Trealoz	+	+	(1)
İnulin	-	-	(1)
Melezitoz	-	+	(1)
Rafinoz	-	+	(1)
Nışasta	+	+	(1)
Glikojen	-	+	(1)
Ksilitol	+	+	(1)
Gentobioz	+	+	(2)
D Turanoz	+	+	(1)
D Lisoz	-	+	(1)
D Tagatoz	+	+	(1)
D Fukoz	-	-	(1)
L Fukoz	-	-	(1)
D Arabitol	+	-	(2)
L Arabitol	-	-	(1)
Gluconate	-	-	(2)
2-Keto-Glukonat	-	-	(1)
5-Keto-Glukonat	-	-	(1)

⁽¹⁾ Nielsen ve ark. (1995); ⁽²⁾ Sonuçlar tarafımızdan elde edilmiştir (2004).

V. 1. 3. Kemotaksonomik Özellikler

GMBAE 22 ve *B. clausii* DSM 8716^T için temel yağ asidi olan iso-C_{15:0}. Iso-C_{15:0} ve anteiso-C_{15:0} incelenen alkalifilik organizmalar içerisinde temel yağ asidi olarak rapor edilmiştir (Yumoto ve diğ., 1998). Senesi ve diğ., (2001) tarafından çalışılan *B. clausii* LMG 19610, *B. clausii* LMG 19634, Enterogermina soyları olarak saptanan türler ve Nielsen ve diğ., (1995) tarafından çalışılan ve izolat GMBAE 22 ile %99 benzerlik gösteren *Bacillus clausii* DSM 8716^T arasında yağ asidi kompozisyonunda görülen yüksek benzerlik izolat GMBAE 22' nin *Bacillus clausii* olduğunu göstermektedir. Filogenetik ağaçta izolat GMBAE 22 tip tür *B. clausii* DSM 8716^T ve diğer *B. clausii* soyları ile aynı kümede yer almıştır.

V. 1. 4. Alkalen Proteaz Enziminin Üretimi ve Kısmi Saflaştırılması

Tez kapsamında, izolat GMBAE 22'den alkalen proteaz enzimi kısmi olarak saflaştırılmıştır. İzolat 22'den elde edilen alkalen proteaz enziminin saflaştırılmasında DEAE-Selüloz anyon değiştirme kromatografisi kullanılmıştır. Saflaştırma sonucunda enzim yaklaşık 2,66 kat saflaştırılmış ve saflaştırma verimi %15 olarak elde edilmiştir. Proje kapsamında elde edilen sonuçlar literature çalışmaları ile karşılaştırılmıştır. Singh ve ark (2001a), yeni izole edilmiş *Bacillus* sp SSR1'den serin alkalen proteaz enzimini, DEAE-Sephadex A-50 kolonunda saflaştırmıştır. DEAE-Sephadex A-50 kolon ile yapılan çalışmalarda elde edilen verim ve saflaştırma katsayısı sırası ile %50.5 ve 16.5 dur. Sepharose 6B kolonu ile yapılan çalışmada ise verimin ve saflaştırma katsayısının sırası ile %36.9 ve 19.3 olduğu bildirilmiştir (Singh ve ark 2001a). Bu proje kapsamında yapılan çalışmada elde edilen verim ve saflaştırma katsayısı daha yüksek değerdedir. Diğer bir çalışmada ise *Bacillus sphaericus*'dan iki alkalen proteaz enziminin saflaştırılması rapor edilmiştir (Singh ve ark 2001b). Buna göre ikinci kromatografi adımından sonra, Proteaz A enzimi için %1 aktivite kazancı ve 327 Um^g⁻¹ spesifik aktivite, proteaz B enzimi için ise %52.2 aktivite kazancı ve 3408 Um^g⁻¹ spesifik aktivite elde edilmiştir. Huang ve diğ., (2003) *Bacillus pumilus*'dan alkalen proteaz enzimini, hidrofobik etkileşim kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanarak saflaştırmışlardır. Son kademededen sonra elde edilen verim ve saflaştırma katsayısı %37.7 ve 25 olarak bulunmuştur. Takami ve diğ., (1989) *Bacillus* sp. No.AH101 den alkalen proteazın saflaştırılmasında, saflaştırma verimini

20%, spesifik aktiviteyi ise 2427 U mg⁻¹ olarak yayınlamışlardır. *Bacillus majovensis*'den alkalen proteaz enziminin saflaştırılmasında ise, Beg ve Gupta (2003) 2250 U mg⁻¹ spesifik aktiviteye sahip enzim için, saflaştırma katsayısını 17 olarak rapor etmişlerdir. DEAE selüloz iyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırılan, *P. aeruginosa* MN1'den elde edilen alkalen proteaz enziminin saflaştırma verimi ve katsayısı, sırası ile % 37.7 ve 24.8 olarak bulunmuştur (Bayoudh ve diğ., 2000).

V. 1. 5. GMBAE 22 Proteazının Karakterizasyonu

Enzimin molekül ağırlığını belirlemek amacı ile yapılan elektroforez çalışmalarında, diğer serin proteazlardan farklı olarak, Coomassie blue R-250 ile herhangi bir bant oluşmadığı görülmüştür. Bunun nedeni enzim örneğini elektroforez için yüklemekten önce denatürasyon koşullarında enzim otolizi olabilir. Otolizi önlemek için, enzim örneği denatürasyon işleminden önce PMSF varlığında ön inkübasyona tutulmuş ve sonra gümüş boyama ile alkalın proteaz bantı görülmüştür. Aynı husus *Bacillus sphaericus*'den elde edilen kemotripsin benzeri Proteaz A ve Proteaz B enzimlerinde (Singh ve diğ., 2001b) ve *Bacillus clausii* GMBAE 42'den elde edilen alkalen proteaz enziminde (Kazan ve diğ., 2005) görülmüştür. 68 kDa molekül ağırlığına sahip *Bacillus sphaericus*'den elde edilen Proteaz B enzimi (Singh ve ark 2001b) gibi bir kaç enzim dışında, mikroorganizmalardan elde edilen alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığı 15 ve 36 kDa arasında değişmektedir. *Bacillus clausii* GMBAE 42'den elde edilen alkalen proteazın molekül ağırlığı 26.5 kDa olarak bulunmuştur (Kazan, 2005). *Bacillus* sp. no. AH-101'den elde edilen alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığı, 29 kDa olarak bulunmuştur (Takami ve ark, 1989). *Bacillus stearothermophilus* F1 dan elde edilen sıcaklığa karşı kararlı alkalen proteaz enzimini molekül ağırlığının 33.5 kDa olduğu rapor edilmiştir (Rahman ve diğ., 1994). *Bacillus* sp. SSR1'den elde edilen alkalen proteaz için molekül ağırlığının 29kDa olduğu (Singh ve ark 2001b) ve *Bacillus pumilus*'den elde edilen enzim için 32 kDa olduğu (Huang ve ark, 2003) duyurulmuştur. *Pseudomonas aeruginosa* M1'den elde edilen alkalen proteaz enzimini molekül ağırlığı ise Bayoudh ve diğ., (2000) tarafından 32 kDa olarak hesaplanmıştır. Beg ve Gupta (2003), *Bacillus majovensis*'den elde edilen alkalen proteaz için molekül ağırlığını 30 kDa olarak hesaplamıştır. Sıcaklığa karşı dayanıklı *Bacillus stearothermophilus* F1'den elde edilen alkalen proteazın molekül ağırlığı, Rahman ve diğ., (1994) tarafından 33.5 kDa olarak bulunmuştur. GMBAE 22 numaralı izolattan elde edilen alkalen proteazın

molekül ağırlığı 25.4 kDa olarak bulunmuştur ki bu değer, literature değerleri ile uyum göstermektedir.

İzolat 22'den, üretilen alkalen proteaz Ca^{2+} iyonları yokluğunda ve varlığında sırasıyla 60°C ve 70°C de, pH 10.5 da en yüksek aktiviteyi göstermiştir. *Bacillus* sp. NG312 (Jasvir ve diğ., 1999), *Bacillus mojavensis* (Beg ve Gupta, 2003), *Pseudomonas aeruginosa* (Bayoudh ve diğ., 2000), *Bacillus* sp. (Oberoi ve diğ., 2001), *Bacillus clausii* I52 (Joo ve ark, 2003), *Streptomyces albidoflavus* (Bressollier ve diğ., 1999) mikroorganizmalardan elde edilen alkalen proteazın optimum sıcaklığı ile ilgili benzer sonuçlar literatürde yer almaktadır. Huang ve diğ., (2003) *Bacillus pumilus*'tan elde edilen hücre dışı alkalen proteaz için optimum sıcaklığın 55°C olduğunu rapor etmişlerdir. *Bacillus* SSR1'dan elde edilen alkalen proteaz enzimi için Ca^{2+} iyonları yokluğunda ve varlığında, optimum sıcaklık değerlerinin sırasıyla 40 ve 45°C olduğu Singh ve diğ., (2001a) tarafından rapor edilmiştir. Joo ve diğ., (2001) *Pericerrula leucophryna* alkalen proteazı için optimum sıcaklık değerini 35°C olarak duyurmuşlardır. Moreira ve diğ., (2002), *Nocardiopsis* sp den elde edilen alkalen proteaz için optimum sıcaklığı 50°C olarak bulmuştur. *Serratia marcenses*'den elde edilen serin alkalen proteaz enzimi için optimum sıcaklık Romero ve diğ., (2001) tarafından 48°C olarak bulunmuştur. Abdel-Naby ve diğ., (1998) *Bacillus mycoides* ile yaptıkları çalışmada, elde ettikleri doğal ve immobilize alkalen proteaz enzimi için optimum sıcaklık değerlerini sırasıyla 50°C ve 55°C olarak bulmuşlardır. *Bacillus horikoshii* tarafından üretilen alkalen proteaz enzimini maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 45°C olarak bulunmuştur (Joo ve diğ., 2001). *Bacillus brevis*'den (Bonerjee ve diğ., 1999) ve *Bacillus licheniformis* MIR29'dan (Ferrero ve diğ., 1996) elde edilen alkalen proteazların optimum sıcaklığının ise 60°C olduğu bildirilmiştir.

İzolat 22 ile yapılan stabilizasyon çalışmalarında, enzimin 30°C'da 180 dakika süre ile %100 kararlı olduğu görülmüştür. Singh ve ark (2001), *Bacillus* sp. SSR1'den elde edilen alkalen proteaz enziminin 40°C'da 6 saat süre ile inkübe edildiğinde, %100 kararlı olduğunu bulmuşlardır. Oberoi ve ark, (2001) ise, 1 saat inkübasyon sonucunda *Bacillus* sp.'den elde edilen alkalen proteazın 45°C'da %100 kararlı olduğunu bulmuştur. *Bacillus horikoshi*'den elde edilen alkalen proteaz ise 50°C'da 1 saat inkübe edildiğinde %100 kararlılık göstermiştir. Fakat enzim 60°C'da 20 dakika inkübe edildiğinde belirli oranda aktivitesini kaybetmiştir (Joo ve ark, 2001). Joo ve ark (2003), *Bacillus clausii* I-52'den elde edilen alkalen proteaz enziminin 1 saat süre ile inkübe edildiğinde, 55°C'a kadar maksimum aktivite gösterdiğini, 60°C'da 30 dakika inkübe edildiğinde ise aktivitesinin % 45'ini kaybettiğini yayınlamışlardır. Son yıllarda deterjan

endüstrisi, enerji tasarrufu sebebi ile daha düşük sıcaklıklarda aktif olan enzim arayışı içine girmiştir. Kannase adı ile bilinen ve Novo Nordisk tarafından geliştirilen deterjanlarda kullanılan proteaz enziminin 10-20°C da kararlılık göstermektedir (Gupta ve diğ., 2002). Yukarıdaki açıklamalar doğrultusunda, GMBAE 22' den elde edilen alkalin proteaz enzimi, düşük sıcaklıklarda uzun süre aktivitesini koruyabilmesinden dolayı, deterjanlarda uygun bir enzim olduğu söylenebilir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda izolat 22'den elde edilen alkalin proteaz enziminin pH 12.0 değerinde maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir ki bu değer literatürdeki bir çok değerın üstündedir. Joo, 2001 ve Singh ve diğ., 2001a literatürlerinde ise optimum pH 10 olarak belirlenmiştir. Banerjee ve diğ., 1999 ile Beg ve ark, 2003 tarafından yapılan araştırmalarda *B. brevis* ve *B. mojavensis*' e ait optimum pH değerinin 10.5 olduğu bulunmuştur. *Bacillus clausii* I-52 (Joo ve diğ., 2003), *Bacillus* sp. NG312 (Jasvir ve diğ., 1999), *Bacillus* sp. JB-99 (Johnvesly ve ark, 2001) ve *Bacillus clausii* GMBAE 42 (Kazan ve diğ., 2005; Denizci ve diğ., 2004) araştırmalarında ise optimum pH değeri 11 olarak rapor edilmiştir.

Deterjan alkalin proteazlarının seçimi için önemli olan etkenlerden biri enzimin yüksek pH'larda aktivitesini korumasıdır. *Bacillus clausii* GMBAE 42 (Kazan ve diğ., 2005) alkalin proteazının pH 9.0 ve 12.2 arasında aktivitesini kaybetmediği, pH 12.5 da ise %24 lük bir kayıp olduğu bulunmuştur. *Bacillus clausii* GMBAE 22'den elde edilen alkalin serin proteaz enzimi; pH 9.0 ve 11 değerleri arasında 30 °C de 24 saat süre ile inkübe edildiğinde hiç bir aktivite kaybının olmadığı saptanmıştır. Enzim pH 12.0' de %96.70 ve pH 12.5' de aynı koşullarda inkübe edildiğinde %20.14 oranında aktivitesini korumaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda, *Bacillus clausii* GMBAE 22 alkalin proteazının yüksek pH değerlerinde kararlı bir enzim olduğu görülmektedir.

GMBAE 22'den elde edilen alkalin proteaz enziminin PMSF (serin inhibitörü) varlığında, aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir. Bu sonuç doğrultusunda enzimin serin alkalin proteaz olduğu söylenebilir. Benzer sonuçlar *Bacillus clausii* I-52 proteazı (Joo ve ark, 2003), *Bacillus* sp. SSR1 proteazı (Singh ve ark, 2001a), *Bacillus* sp. NG312 proteazı (Jasvir ve ark 1999), *Bacillus horikoshii* proteazı (Joo ve diğ., 2001), *Bacillus pumilus* proteazı (Huang ve diğ., 2003), *Bacillus* sp. JB99'den elde edilen proteaz enzimi (Johnvesly ve diğ., 2001), *Bacillus licheniformis*'den elde edilen proteaz enzimi (Ferrero ve diğ, 1996), *Bacillus stercophilus* F1'den üretilen termotabil alkalin proteaz enzimi (Rahman ve diğ., 1994) ve *Nocardiopsis* sp. proteazı (Moreira ve diğ., 2002) için elde edilmiştir.

Hammarsten kazein ile yapılan kinetik çalışmalarda GMB AE 22 alkale n proteazının K_m , V_m ve k_{cat} de ğerleri sırasıyla 1.32 mg/ml hammarsten casein, 621 U/ml/dakika ve 469.51 1/dakika olarak bulunmuştur. *B. clausii* GMB AE 42 alkale n proteazının K_m , V_m ve k_{cat} de ğerleri sırasıyla 1.8 mg/ml hammarsten casein, 11.50 U/ml/dakika ve 2.13×10^3 1/dakika olarak bulunmuştur. (Kazan ve di ğ., 2005)

V. 2. DE ĞERLENDİRME

Te z kapsamında elde edilen sonuçlar a şa ğıda özetlenmiştir.

1. Proje kapsamında TÜBİTAK GMB AE, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı tarafından izole edilen 146 izolat, enzimleri a çısından taranmış ve iki izolat amilaz üreticisi, 17 izolat ise proteaz üreticisi olarak seçilmiştir.
2. İzolat GMB AE 42 ve *Bacillus clausii* DSM 8716^T arasında, küçük fenotipik farklılıklar bulunmasına rağmen, 16S rRNA dizisi ve yağ asitleri analiz sonuçlarına göre *Bacillus clausii* olarak tanılanmıştır.
3. 17 izolat arasında en kısa sürede en iyi alkale n proteaz üreticisi izolat (22 numaralı izolat) belirlenmiş ve *B. clausii* olarak tanılanmıştır. *B. clausii* GMB AE 22 adı ile NCIB (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası'ndan a ccession numarası DQ131908 alınmıştır.
4. Enzim üretiminin büyümeye ba ğlı oldu ğu ve en yüksek üretime fermentasyonun 48.nci saatinde ula şıldığı bulunmuştur.
5. Fermentasyonla üretilen hücre dışı enzim için laboratuvar ölçe ğinde bir kısmi saflaştırma prosesi geliştirilmiştir.
6. GMB AE 22' den saflaştırılan enzimin molekül a ğırlığının 25.4 kDa ve serin tip alkale n proteaz oldu ğu belirlenmiştir.
7. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C ve 5 mM Ca⁺² iyonu varlığında ise 70°C olarak bulunmuştur.
8. İzolat GMB AE 22 ile yapılan stabilizasyon çalışmalarında, kısmi olarak saflaştırılan alkale n proteaz enziminin 30°C'da 180 dakika süre ile %100 kararlı oldu ğu görülmüştür. 40°C ve 50 °C' de 180 dakika süre sırası ile %93.65 ve %90.04 aktivitesini korudu ğu saptanmıştır.
9. Enzimin optimum pH de ğeri, yapılan deneysel çalışmalar sonucunda 12.0 olarak belirlenmiştir. pH 9.0 ve 11.0 de ğerleri arasında 30 °C'de 24 saat süre ile inkübe edildiğinde hiç bir aktivite kaybının olmadığı saptanmıştır. Enzim, pH Enzim pH 12.0'

de %96.70 ve pH 12.5' de aynı koşullarda inkübe edildiğinde %20.14 oranında aktivitesini korumaktadır.

10. Ticari olarak üretilen proteazlar ve özellikleri, GMBAE 22 tarafından üretilen alkali serin proteaz özellikleri ile karşılaştırmalı olarak Tablo V. 3.' de verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi GMBAE 22' den elde edilen alkalen proteaz enzimi, ticari deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanılabilme özelliği göstermektedir.

Tablo V. 3. GMBAE 22 proteazının ticari proteazlar ile karşılaştırılması

Ticari Proteaz	Kaynak	Optimum pH	Optimum Sıcaklık	Kaynak
GMBAE 22	<i>B.clausii</i>	12	60	GMBAE
GMBAE 42	<i>B.clausii</i>	11.3	60	GMBAE
Alcalase	<i>B. licheniformis</i>	7-10	60	Novozymes, Denmark
Savinase	<i>B. lentus</i>	8-11	50-60	Novozymes, Denmark
Esperase	<i>B. lentus</i>	7-12	50-65	Novozymes, Denmark
Maxatase	<i>B. subtilis</i>	9-10	50-60	Gist-brocades, The Netherlands
Opticlean	<i>B. alcalophilus</i>	8-11.5	15-60	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Optimase	<i>B. licheniformis</i>	7.5-10.5	15-65	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Everlase	Protein Mühendisliği ile geliştirilmiş Savinase	8-11	50	Novozymes, Denmark
Durazyme	Protein Mühendisliği ile geliştirilmiş Savinase	8-11	50	Novozymes, Denmark
Maxapem	Protein Mühendisliği ile geliştirilmiş alkalofilik <i>Bacillus sp.</i>	11-12	60	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Profect	<i>B. lentus</i> kökenli <i>Bacillus sp.</i> expresse edilmiş	10	40-65	Genecor International, Inc., USA

V. 3. Öneriler

İleride aşağıdaki belirtilen çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

- GMBAE 22' nin daha üretken hale getirilmesi,
- Büyük ölçekli üretim sürecinin geliştirilmesi.
- Daha yüksek mertebede saflaştırma süreci geliştirilmesi

VI. KAYNAKLAR

Abdel-Naby, M.; Ismail, A-M. S.; Ahmed, S. A.; Abdel Fattah, A. F. : “Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*”, *Bioresource Tech.*, 64 (1998) 205-210.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, M., Myers, E. W.; Lipman, D. J.: “Basic local alignment search tool”, *Journal of Mol. Biol.*, 215 (1990) 403-410.

Anvar, A.; Saleemuddin, M.: “Alkalene Proteases: A Review”, *Bioresource Technology*, 64 (1998) 175-183.

Atlan, A.: “Laboratuvar Tekniği, Tarım Ürünleri Teknoloji Kitabı”, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ofset ve Teksir Atölyesi, No: 36, Adana, (1989) 172.

Banerjee, U. C.; Sani, R. K.; Azmi, W.; Soni, R.: “Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive”, *Process Biochem.*, 35 (1999) 213-219.

Baran, Ayşe.: “*Bacillus* türlerinden alanin dehidrogenaz izolasyonu ve kısmi saflaştırılması”, *Yüksek Lisans Tezi*, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, (2000) 27-54.

Bradford M. M. : “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Analytical Biochemistry*, 72 (1976) 248-254.

Bayoudh, A.; Gharsallah, N.; Chamkha, M.; Dhouib, A.; Ammar, S.; Nasri, M.: “Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24 (2000) 291-295.

Beg, K.Q.; Gupta, R.: “Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 32 (2003) 294-304.

Bressollier,P.; Letourneau, F.; Urdaci, M.; Verneuil, B.: “Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (1999) 2570-2576.

Çalık, P.; Çalık, G.; Özdamar, T. H. : “Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: Use the citric acid as the carbon source”, *Enzyme Microbiological Technology*, 23 (1998) 451-461.

Çalık, P.; Çalık, G.; Tokaç, S.; Özdamar, T. H. : “Metabolic flux analyses for serine alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in a defined medium: Effects of the oxygen transfer rate”, *Biotechnology Bioengineer*, 64 (1999a) 151-167.

Çalık, P.; Özdamar, T. H. : “Mass flux balance based model and metabolic pathway engineering analysis for serine alkaline protease synthesis by *Bacillus licheniformis*”, *Enzyme Microbiological Technology*, 24 (1999b) 621-635.

Çalık, P.; Tokaç, S.; Çalık, G.; Özdamar, T. H. : “Serine alkaline protease over production capacity of *Bacillus licheniformis*”, *Enzyme Microbiological Technology*, 26 (2000a) 45-60.

Çalık, P.; Özdamar, T. H. : “Metabolic flux analyses for serine alkaline protease production”, *Enzyme Microbiological Technology*, 27 (2000b) 793-805.

Çalık, P.; Çalık, G.; Özdamar, T. H. : “Oxygen transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*”, *Biotechnology Bioengineer*, 69 (2000c) 301-311.

Çalık, P.; Özdamar, T. H. : “Carbon sources affects metabolic capacities of *Bacillus* species for the production of industrial enzymes: Theoretical analyses for serine and neutral protease and α -amylase”, *Biochemistry Enginer Journal*, 8 (2001) 61-81.

Denizci, A. A.; Kazan, D.; Abeln, E. C. A., Erarslan, A.: “Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions”, *Journal of Applied Microbiology*, 96(2) **(2004)** 320-327.

Ferreo, M. A.; Castro, G. R.; Abate, C. M.; Bagion, M. D.; Simeriz, F.: “Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR29: Isolation, production and characterization”, *Applied Microbiological Biotechnology*, 45 **(1996)** 327-332.

Fredy, J. R.; Garcia, L. A.; Salas, J. A.; Biaz, M.; Quiros, M. L.: “Production, purification and partial characterization of two extracellular protease from *Serratia marcescens* grown in whey”, *Process Biochemistry*, **(2001)** 507-515.

Fritze, D.: “*Bacillus haloalkaliphilus* sp.”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46 **(1996)** 98-101.

Fritze, D.; Flossdorf, J.; Claus, D.: “Taxonomy of alkaliphilic *Bacillus* Strains”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40 **(1990)** 92-97.

Gerhardt, P.; Murray R. G. E.; Castilow E. W. N.; Wood W. A.; Krieg R. N.; G.B. : Manual of Methods for General Bacteriology, American Society of Microbiology, Washington, D.C., USA, **(1981)** 791.

Gupta. R.; Gupta. K.; Saxena. R. K., Khan S.: “Bleach-stable alkaline protease from *Bacillus* sp.”, *Biotechnol Lett*, 21 **(1999)** 135-138.

Gupta. R.; Beg. Q. K.; Lorenz. P.: “Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications”, *Applied Microbial Biotechnol*, 59 **(2002)** 15-32.

Horikoshi, K.: “Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganism Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* , *Agricultural Biological Chemistry*, 221-13 **(1971)** 1414.

Huang, Q.; Peng, Y.; Li, X.; Wang, H.; Zhang, Y.: “Purification and characterization of an alkaline serine protease from dehairing function from *Bacillus pumilus*”, *Current Microbiology*, 46 **(2003)** 169-173.

Ito, S.; Kobayashi, T.; Ara, K.; Ozaki, K.; Kawai, S.; Hatada, Y.: “Alkaline detergent enzymes from alcaliphiles: Enzymatic properties, Genetics and Structures”, *Extremophiles*, 2 **(1998)** 185-190.

Jasvir. S.; Navdeep.G.; Devasahayam. G.; Sahoo. D. K.: “Studies on alkaline protease produced by *Bacillus* sp. NG312”, *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 76 **(1999)** 57-63.

Joo, H-S.; Kumar, C. G.; Park, G-C.; Kim, K. T.; Seung, R. P.; Chang, C-S.: “Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshi*”, *Process Biochemistry*, 38 **(2002)** 155-159.

Joo, H-S.; Kumar, C. G.; Park, G-C.; Kim, K. T.; Seung, R. P.; Chang, C-S.: “Simple method for alkaline protease purification from polychaeta, *Pericerrula leucophryna*”, *Process Biochemistry*, 37 **(2001)** 299-303.

Joo, H-S.; Kumar, C. G.; Park, G-C.; Paik, S. R.; Chang, C-S.: “Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I52: production and some properties”, *Journal of Applied Microbiology*, 95 **(2003)** 267-272.

Johnvesly, B.; Naik, G. R.: “Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp, JB-99 in a chemically defined medium”, *Process Biochemistry*, 37 **(2001)** 139-144.

Jukes, T. H.; Cantor, C. R.: Evolution of protein molecules. In Mammalian Protein Metabolism ed. Murofushi, H.N. pp 21-132. New York: Academic Press, USA, **(1969)**.

Kazan, D.; Denizci, A. A.; Öner, M. N. K.; Eraslan, A.: “Purification and characterization of aserine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42” *Journal of Industry Microbiology and Biotechnology*, 32, **(2005)** 335-344.

Kaur, S.; Vohra, R. M.; Kapoor, M.; Beg, Q. K.; Hoodal, G. S.: “Enhanced production and characterization of an highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2.”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17 **(2001)** 125-129.

Kumar, C. G.; Takagi, H.: “Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint”, *Biotechnology Advances*, 17 (1999) 561-594.

Kobayashi, T.; Hakamada, Y.; Hitomi, J.; Koike, K., Ito, S.: “Purification of a alkaline protease from *Bacillus* strains and their possible interrelationship”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45 (1996) 63-71.

Labeda, D. P.: Isolation of biotechnological organisms from nature, McGraw-Hill, New York, USA, (1990).

Laemmli, U. K.: “Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, 227 (1970) 680-685.

Macbrouk, S. S.; Hashem, A. M.; El-Shayeb N. M. A.; Ismail, A. S.; Abdel-Fattah A. F.: “Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415”, *Bioresource Technology*, 69 (1999) 155-159.

Marmur, J.; Doty, P.: “Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature”. *Journal of Molecular Biology*, 5 (1962) 109-118.

Mehrotra, S., Pandey, P.K.; Gaur, R.; Darmwal, N. S.: “The Production of alkaline protease by *Bacillus* species isolate”, *Bioresource Technology*, 67 (1999) 201-203.

Moreira. K. A.; Albuquerque. B. F.; Teixeira. M. F. S.; Porto. A. L. F.; Lima F. J. L.: “Application of protease from *Nocardiopsis* sp. as a laundry detergent additive”, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18 (2002) 307-312.

Nielsen, P.; Rainey, A.; Outtrup, H.; Priest, F. G.; Fritze, D.: “Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a six rRNA group within the genus *Bacillus*”. *FEMS Microbiology Letters*, 117 (1994) 61-66.

Nielsen, P.; Fritze, D.; Priest, F. G.: “Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species”, *Microbiology* 141 (1995) 1745-1761.

Nomoto, M.; Lee, T. C.; Su, C. S.; Liao, C. W.; Yen, T. M.; Yang, C. P.; “Alkaline Protease from Alkalophilic Bacteria of Taiwan”, *Agricultural and Bioogical Chemistry*, 48 (6) **(1984)** 1627-1628.

Norris, J. R.; D.W. Ribbons (eds.): *Methods in Microbiology*, Academic Press, New York, USA, 6A **(1971)** 1-52.

Oberoi, R.; Beg, Q. K.; Puri, S.; Saxena, R. K.; Gupta, R.: “Characterization and wash performance of an SDS-stable alkaline protease from *Bacillus sp.*”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17 **(2001)** 493-497 .

Onmuş, F.:”subtilisin (Alkaline proteaz) üreticisi *Bacillus* türü bakterilerin taranması ve proteaz aktivitelerinin ölçülmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, **(2000)**, 27-55.

Owen, R. J.; Hill, L. P.; Lapage, S. P.: “Determination of DNA base composition from melting profiles in dilute buffers”, *Biopolymers*, 7 **(1969)** 503-516.

Phadatare, S. U.; Srinivasan, M. C.; Deshpande, V. V.: “High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents”, *Enzyme and Microbial Technology*, 15 **(1993)** 72-76.

Rahman, Abd. R. N. Z.; Razak C. N.; Ampon, K.; Basri, M.; Yunus, W. Md. Z. W.; Salleh, A. B.: “Purification and characterization of a heat-satble alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus F1*”, *Aplied Microbiology Biotechnology*, 40 **(1994)** 822-827.

Rainey, F. A.; Ward-Rainey, N.; Koppenstedt, R. M.; Stackebrandt, E.: “The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coheent taxon and a distinct Actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. Now”, *Inertional. Journal of Systematic Bacteriology*, 43-4 **(1996)** 1088-1092.

Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V.: “Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62-3 (1998) 597-635.

Rapp, P.; Backhaus, S.: “Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast and bacteria”, *Enzyme and Microbiology Technology*, 14 (1992) 938 – 943.

Romero, J. F.; Garcia, A. L.; Solas, A. J.; Diaz, M.; Luis, M. Q.: “Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* growing in whey”, *Process Biochemistry*, 36 (2001) 507-515.

Saeki, K.; Hitomi, J.; Okuda, M.; Hatada, Y.; Kageyama, Y.; Takaiwa, M.; Kubota, H.; Hagihara, H.; Kobayashi, T.; Kawai, S.; Ito, S.: “A novel species of alkaliphilic *Bacillus* that produced an oxidatively stable alkaline serine protease”, *Extremophiles*, 6 (2002) 65-72.

Saitou, N.; Nei, M.: “A neighbor-joining method: new method for reconstructing phylogenetic trees”, *Molecular Biology and Evolution*, 44 (1987) 406-425.

Sedmak, J. J.; Grossberg, S. E.: “A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Comassie Brilliant Blue G250”, *Analytical Biochemistry*, 79 (1977) 544-552.

Senesi, S.; Celandroni, F.; Tvanti, A.; Ghelardina, E.: “Molecular characterization and identification of *Bacillus clausii* strains marketed for use in oral bacteriotherapy”, *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (2001) 834-839.

Singh, J.; Batra, N.; Sobti, R.C.: “Serine alkaline protease from newly isolated *Bacillus* sp. SSR1”, *Process Biochemistry*, 36 (2001a) 781-785.

Singh, J.; Vohra, R. M.; Sahoo, D. K.: “Purification and characterization of two extracellular alkaline protease from a newly isolated obligate alkalophilic *Bacillus sphaericus*”, *Process Biochemistry*, 26 (2001b) 387-393.

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Baltimore: Williams and Wilkins, (1986).

Spector, T., Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation, *Analytical Biochemistry*, 86 (1978) 142-146.

Şentürk, S.: “Alkali toprak ve su öeneklerinde, Alkalofilik, Alkalotolerant bakterilerin izolasyon ve identifikasyonu”, Yüksek Lisans Tezi , Ege üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, **(1993)** 67.

Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K., Production of extremely thermo stable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30 **(1989)** 120-124.

Takami, H. and Horikoshi, K., Analyses of the genome an alkaliphilic *Bacillus* strains from an industrial point of view. *Extremophiles* 4 **(2000)** 99-108.

Takami, H., Nogi, Y. and Horikoshi, K., Reidentification of the keratinase producing facultatively alkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*. *Extremophiles* 3 **(1999)** 293-296.

Takami, H. and Krulwich, T.A., Reidentification of facultatively alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 as *Bacillus pseudofirmus* OF4. *Extremophiles*, 4 **(2000)** 19-22,

Tamer, A. Ü.; Oskay, M.: “bakteriyoloji Laboratuar Uygulamaları”, Celal Bayer Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 1. Baskı, Türkiye, Manisa, **(2001)** 145.

Tamer, A. Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Busalıoğlu, M. ve Oğultekin, R., , Mikrobiyoloji Laboratuvarı Klavuzu, . Baskı Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Teks. Ser. No: 55, İzmir, 260 sayfa **(1989)**.

The Oxoid Manual, third edition (reprint), Oxoid Limited, London, **(1967)** 310p.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighing

position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, 22 (1994) 4673-4680.

Uçar, F; Yaşa, I.; Gezer, T.: “İzolasyon identifikasyonları yapılmış 13 alkalofilik proteaz aktivitelerinin saptanması”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Araştırma Fonu Proje Raporu No: 1996, Fen 16 (1998).

Yumoto, I., Yamazaki, K., Sawabe, T., Nakano, K., Kawasaki, K., Ezura, Y. and Shinano, H., *Bacillus hortii* sp.nov: a gram-negative alkaliphilic *Bacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48 (1998) 565-571.

Van der Laan, J.C. ; Gerritse, G.; Mulleners, L. J.; Van Der Hoek, R. A.: “Cloning, characterization and multiple chromosomal integration of a *Bacillus* alkaline protease gene”. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (1991) 901-909.

Vedder, A.: “*Bacillus alcalophilus* n. Sp.; beneves enkele ervaringen met sterk alkalische voedingsbodems. Antonie van Leeuwenhoek, *Journal of Microbiology*.; 1 (1934) 143-147.

Bildiri ve Yayınlar

Ağırdemir H.; Denizci A. A., Kazan D and Erarslan A., The Investigation of the Phenotypic Properties of Bacterial Cultures Isolated From Local Ecosystems Able to Produce Industrially Important Enzymes. 13th Balkan Biochemical Biophysical Days & Meeting on Metabolic Disorders, TURKEY, *Turkish Journal of Biochemistry*, 28- 3 (2003) 143.

EK A. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Boyalar

ÇÖZELTİ 1. 1 M Sodyum Sesquikarbonat Tampon (pH: 10.5)

NaHCO ₃	4.2 gr
Na ₂ CO ₃	5.3 gr
Distile Su	100 ml

Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121°C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. pH 10.5’ e ayarlamak için besiyerlerine %1 oranında ilave edilmiştir.

ÇÖZELTİ 2. %1’ lik Kongo Kırmızısı

Kongo red	1 gr
Distile su	100 ml

Boya selüloz üreten mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılmıştır. Boyanın fazlası 1 N HCl ile yıkanmıştır ve 15 saniye sonucunda koloni çevresinde açık transparan zonlar oluşturması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

ÇÖZELTİ 3. Brom Timol Mavisi

Brom Timol Mavisi	0.1 gr
NaOH (0.05 N)	3.2 ml
Etil alkol (%96’ lık)	55 ml
Distile Su	191.7 ml

0.1 gr Brom Timol Mavisi, 3.2 ml 0.05 N NaOH ve 5 ml %96’lık etil alkolde ısıtılarak çözülür ve sonra 50 ml daha %96’lık etil alkol katılıp, hacmi su ile 250 ml’ye tamamlanır (Atlan, 1989).

ÇÖZELTİ 4. Fenol Kırmızısı İndikatör Çözeltisi

Fenol kırmızısı	0.2 gr
-----------------	--------

Etanol (%95)	500 ml
Distile su	500 ml

Fenol kırmızısı etanol de çözülmüştür ve üzerine distile su ilave edildikten sonra sonuç çözeltisi filtre kağıdından geçirilmiştir (Tamer ve Oskay, 2001).

ÇÖZELTİ 5. Gram İyodür Çözeltisi

İyot	1.0 gr
Etanol (%75' lik)	250 ml
Distile su	250 ml

İyot ve potasyum iyodür, havanda iyice toz haline getirilmiş ve üzerine yavaş yavaş su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

ÇÖZELTİ 6. Gram'ın Kristal Violet Boyası

Kristal Violet	2.0 gr
Etil alkol (%95' lik)	20 ml
Amonyum Oksalat	0.8 gr
Distile su	80 ml

20 ml etanolde 2 gr kristal violet boyası çözünmüştür. Ayrı bir kap içinde 80 ml distile suda 0.8 gr amonyum oksalat karıştırılmış ve bu çözelti boya çözeltisine ilave edilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

ÇÖZELTİ 7. Gram'ın Safranin Boyası

Safranin	0.25 gr
Etanol (%95' lik)	10 ml
Distile su	1000 ml

Safranin, etanolde çözülüp, distile su ilave edilerek iyice karıştırılmış ve sonra filtre kağıdından süzölmüştür (Tamer ve ark., 1989).

ÇÖZELTİ 8. %1'LİK Tetrametil Parafenilen Diamin Dihidroklorid (TPDD)

Tetrametil Parafenilen Diamin Dihidroklörür 1 gr

100 ml distile suda çözünmüştür (Gerhardt ve ark., 1981). Oksidaz testinde kullanılmıştır.

ÇÖZELTİ 9. %3'lük H₂O₂

Katalaz denemesinde kullanılmıştır.

ÇÖZELTİ 10. Naftol Çözeltisi

Naftol 5 gr

%95'lik Etanol 100 ml

Naftol etanolde çözülerek hazırlanmıştır. V-P denemesinde kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

ÇÖZELTİ 11. %40' lık KOH Çözeltisi

KOH 40 gr

Kreatin 0.3 gr

Distile su 100 ml

KOH, 75 ml suda çözülür oda sıcaklığında bir süre bekletilmiştir. İçine keratin ilave edilerek iyice çözüldükten sonra distile suyun 25 ml' si ilave edilerek hazırlanmıştır. V-P denemesinde kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

ÇÖZELTİ 12. Kovaks Çözeltisi

Paradimetil Amino Benzaldehit (PDAB) 5.0 gr

Amil veya Butil alkol 75 ml

%37'lik HCl 25 ml

PDAB, alkolde çözündürülüp, su banyosunda hafifçe ısıtılmıştır. Bütün bu içerikler çözündürüldükten sonra üzerine HCl dökülüp karıştırılmıştır. Çözelti İndol üretiminin belirlenmesinde kullanılmıştır.

ÇÖZELTİ 13. Sülfanilik Asit Çözeltisi

Sülfanilik Asit	8.0 gr
Asetik asit (5N)	1000 ml
veya	
Glasial asetik asit	294 ml
Distile su	706 ml

Glasial asetik asit veya 5N asetik asit, distile suya ilave edilerek iyice karıştırılır. Nitrat redüksiyonu denemesinde kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

ÇÖZELTİ 14. %10' luk (w/v) Demir-3- Klorür Çözeltisi

FeCl ₃	0.25 gr
Distile su	1000 ml

FeCl₃ bir miktar distile su ile çözülür üstüne kalan su ilave edilir.

ÇÖZELTİ 15. Dihidroksi Aseton Üretiminin Tespit Çözeltileri

A- CuSO ₄ .5H ₂ O	34.66 gr
Distile su	500 ml
B- Potasyum sodium tartarat	173 gr
Sodyum hidroksit	50 gr
Distile su	500 ml

Solusyon A ve B 1:1 oranında karıştırılır. Taze sonuç çözeltisi koloni üzerine damlatılır. 2 saat süre içerisinde koloni çevresinde kırmızı halkanın oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilir.

ÇÖZELTİ 16 :İndol Test Çözeltisi

p-dimethylaminobenzaldehyde	5 gr
İso-amyl alcohol	75 ml
Konsantre hidroklorik asit	25 ml

Kimyasallar kuvvetlice karıştırılır. Tripton Broth’ da alkol tabakası içerisinde oluşan kırmızı veya pembe renk pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

ÇÖZELTİ 17 : Boya Bağlama Çözeltisi

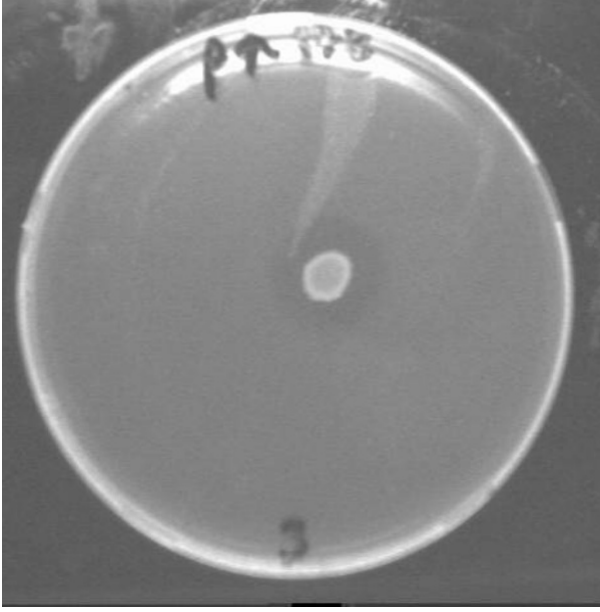
Coomassie brilliant blue G-250 boyası (600 mg), 1 litre % 2 Perklorik asit (%70’ lik) içerisinde iyice çözölmüş ve çözelti filtreden geçirilmiştir. Çözelti koyu renk cam şişede +4°C’ de saklanmıştır. Protein miktarının belirlenmesi deneyinde kullanılmıştır.

ÇÖZELTİ 18 : Elektroforezde Gümüş Boyamada Kullanılan Çözeltiler

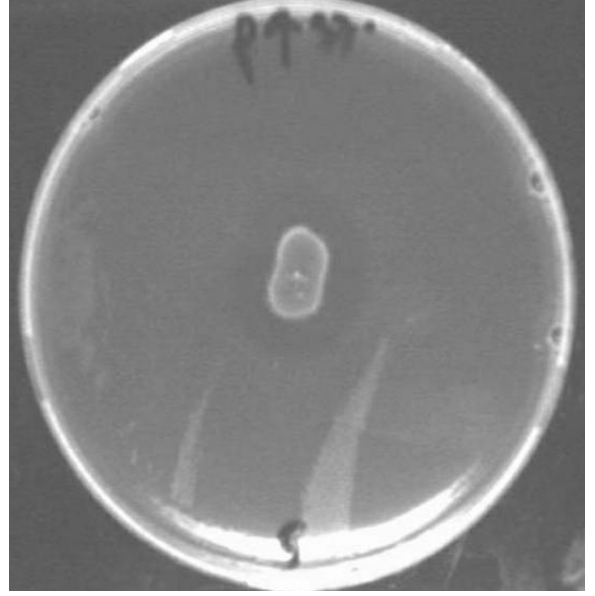
Fiksasyon	: 30 ml Etanol 10 ml Asetik asit 60 ml Distile su
Çözelti 2	: % 20 Etanol
Çözelti 3	: 0.2 gr/L Sodyumtiyosülfat
Gümüş Çözeltisi	: 2 gr/L Gümüş nitrat
Gelişme Çözeltisi	: 30 gr/L Sodyum karbonat (susuz) 0.25 ml/L %35 Formaldehit 10 mgr/L Sodyumtiyosülfat
Stop Çözeltisi	: 50 gr/L Tris-baz 25 mL/L Asetik asit
Bekletme Çözeltisi	: %1 Asetik asit

Çözeltilerin hepsi taze hazırlanıp kullanılmalıdır.

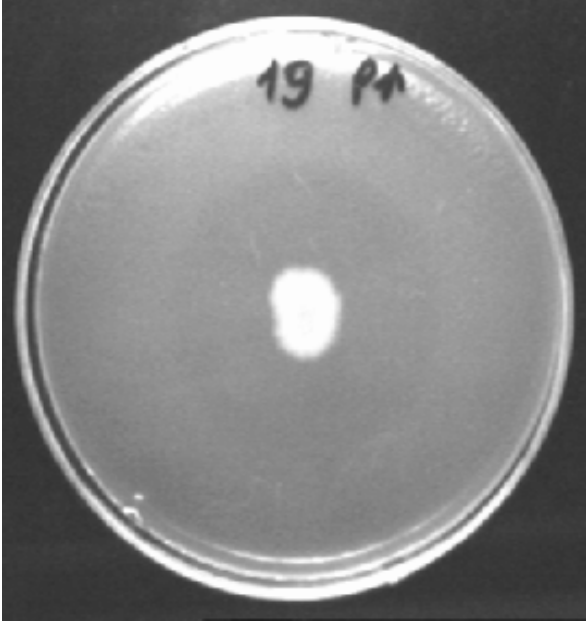
EK B: Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Varlığının Gösterilmesi



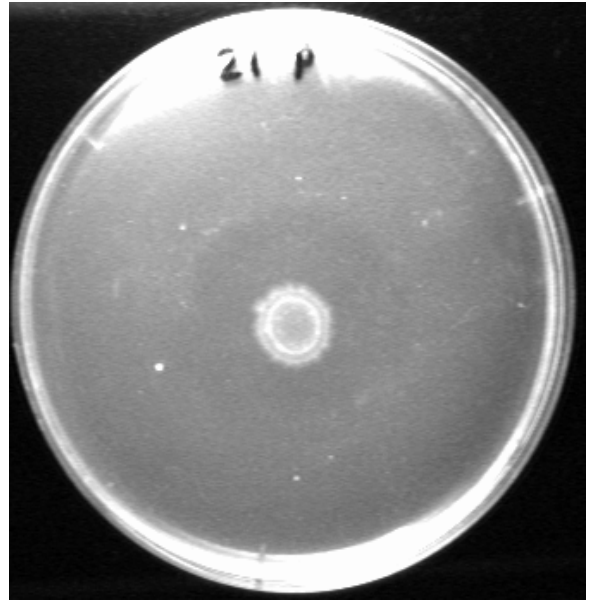
Şekil B. 1. GMBAE 3 nolu İzolatın Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Aktivitesi



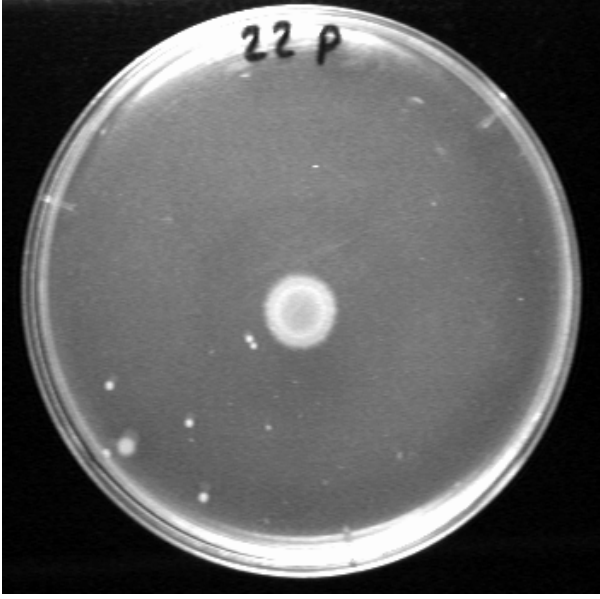
Şekil B. 2. GMBAE 5 nolu İzolatın Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Aktivitesi



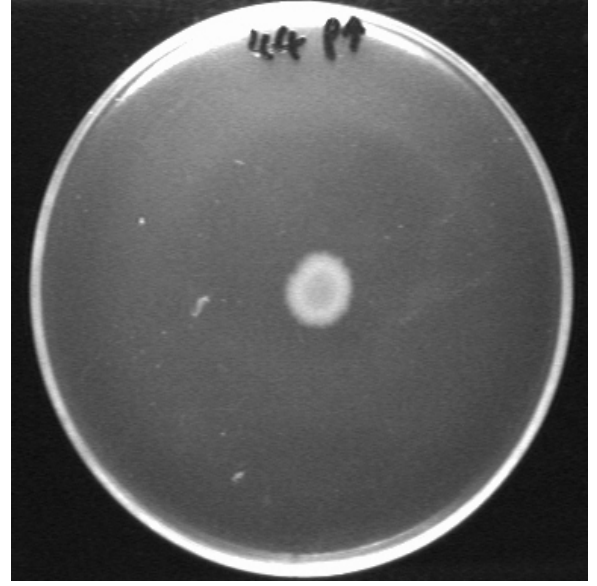
Şekil B. 3. GMBAE 19 nolu İzolatın Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Aktivitesi



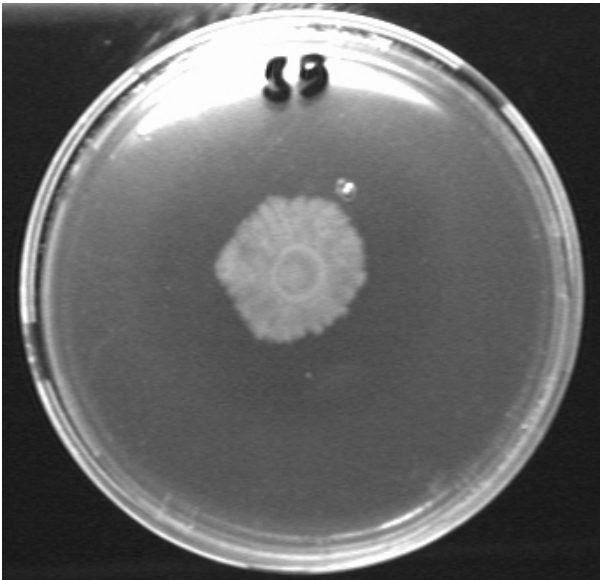
Şekil B. 4. GMBAE 21 nolu İzolatın Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Aktivitesi



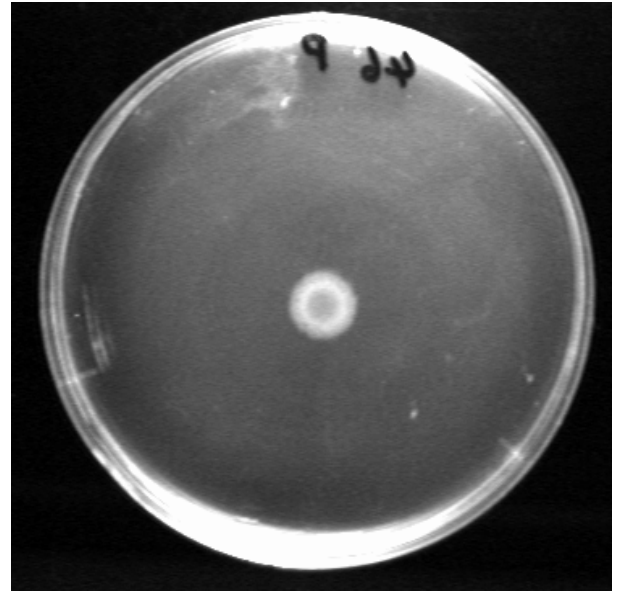
Şekil B. 5. GMBAE 22 nolu İzolatın Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Aktivitesi



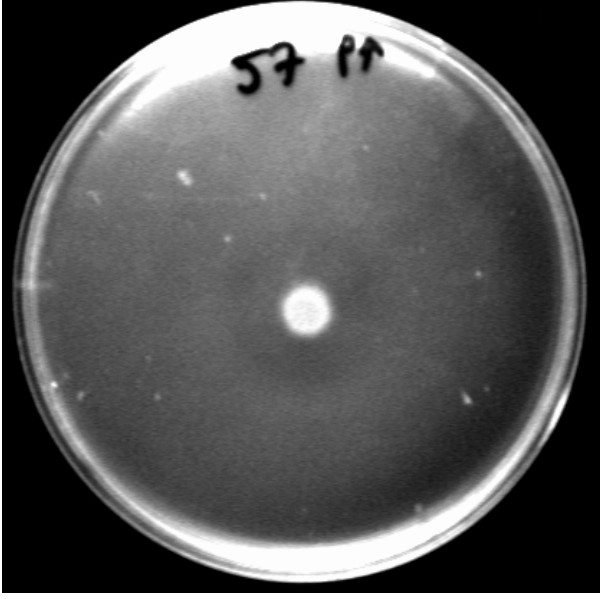
Şekil B. 6. GMBAE 44 nolu İzolatın Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Aktivitesi



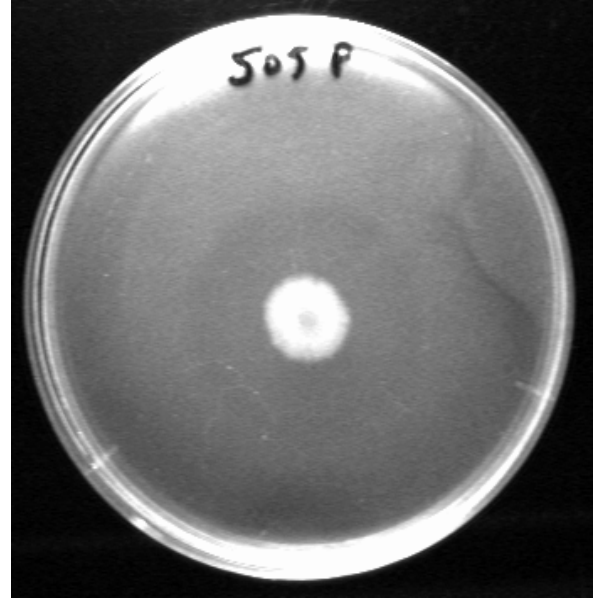
Şekil B. 7. GMBAE 39 nolu İzolatın Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Aktivitesi



Şekil B. 8. GMBAE 46 nolu İzolatın Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Aktivitesi



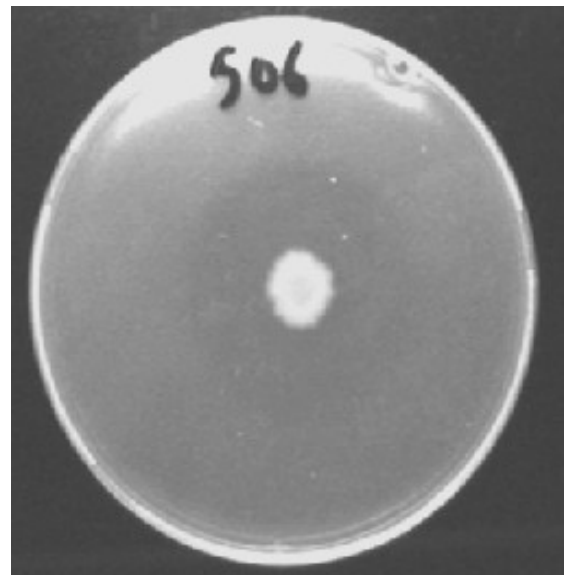
Şekil B. 9. GMBAE 57 nolu İzolatın Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Aktivitesi



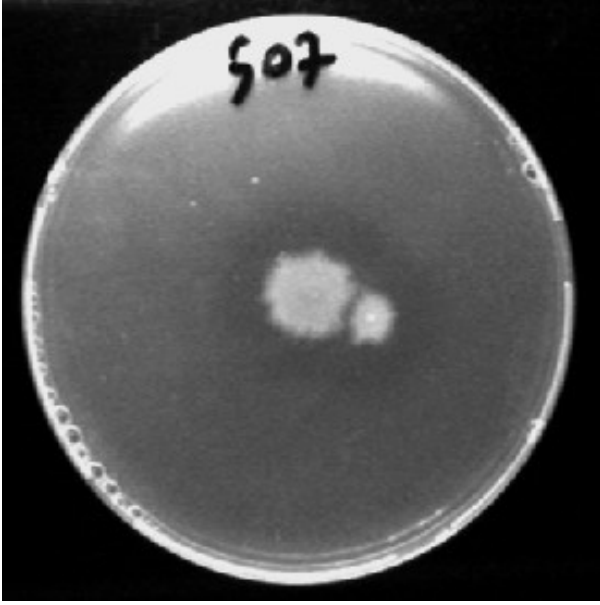
Şekil B. 10. GMBAE 505 nolu İzolatın Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Aktivitesi



Şekil B. 11. GMBAE 504 nolu İzolatın Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Aktivitesi

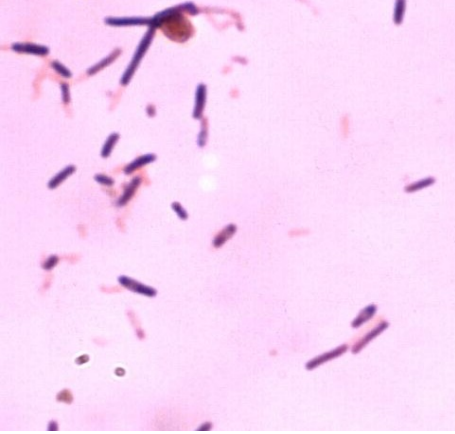


Şekil B. 12. GMBAE 506 nolu İzolatın Katı Besiyerinde Alkalen Proteaz Aktivitesi

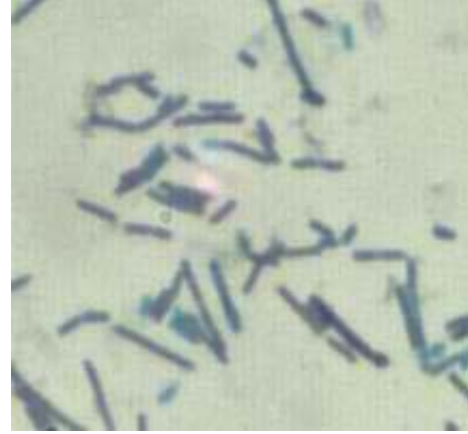


Şekil B. 13. GMBAE 507 nolu İzolatın Katı
Besiyerinde
Alkalen Proteaz Aktivitesi

EK C. İzolatların Işık Mikroskopundaki Görüntüleri



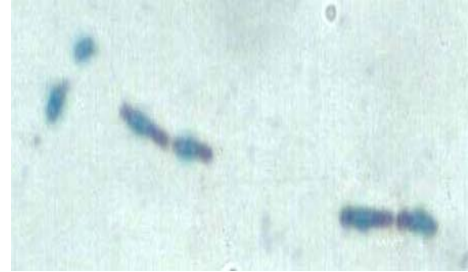
Şekil C. 1. GMBAE 3 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 20. GMBAE 3 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 2. GMBAE 5 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



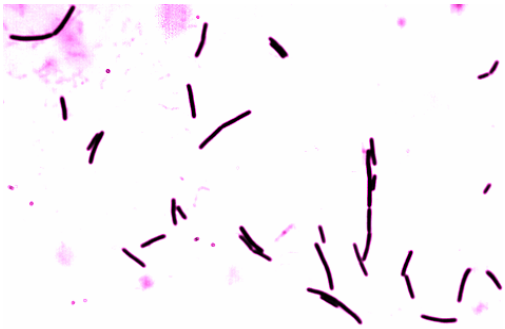
Şekil C. 21. GMBAE 5 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



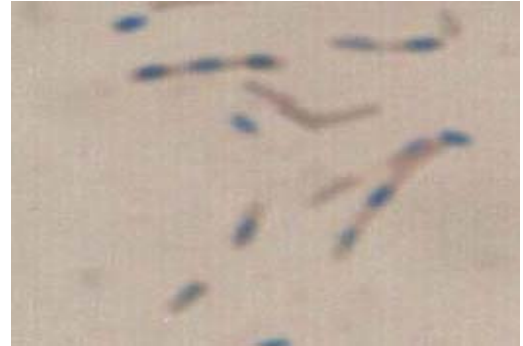
Şekil C. 3. GMBAE 19 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 22. GMBAE 19 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



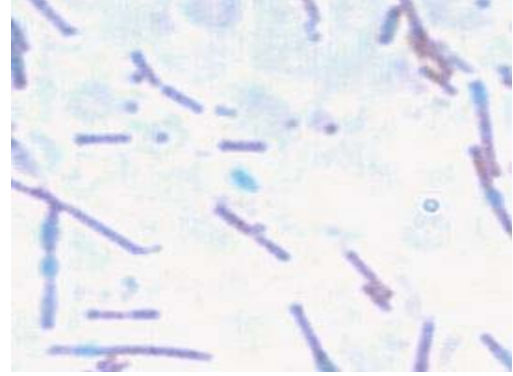
Şekil C. 4. GMBAE 20 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



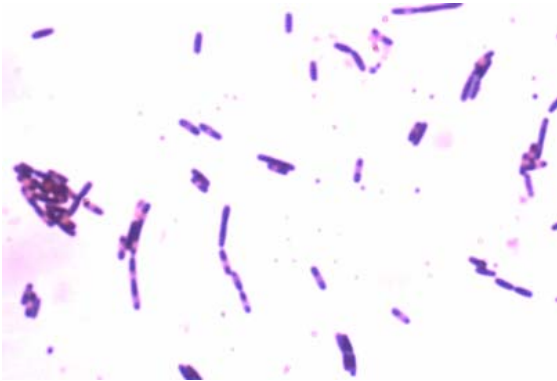
Şekil C. 23. GMBAE 20 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



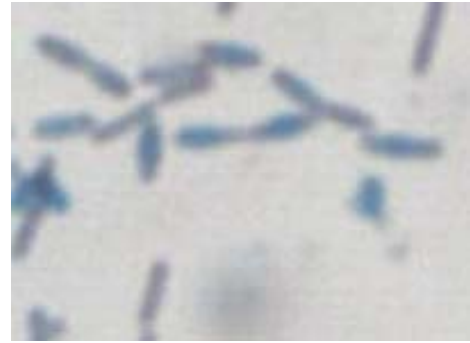
Şekil C. 5. GBAE 21 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



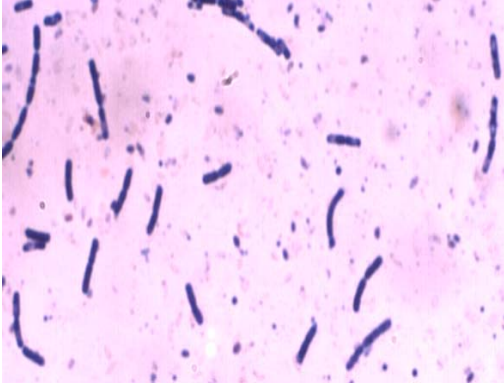
Şekil C. 24. GBAE 21 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 6. GBAE 22 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



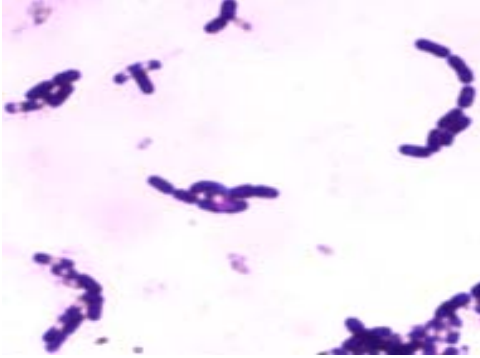
Şekil C. 25. GBAE 22 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 7. GMBAE 34 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



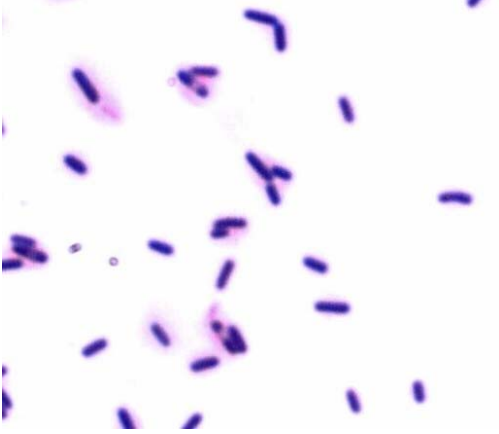
Şekil C. 26. GMBAE 34 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



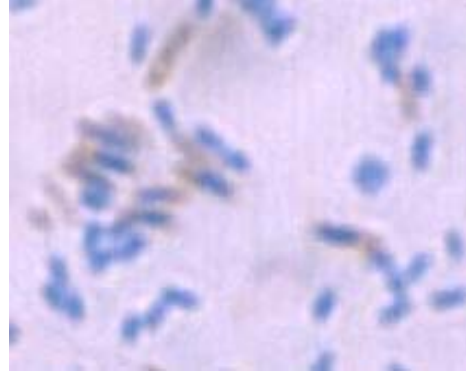
Şekil C. 8. GMBAE 39 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



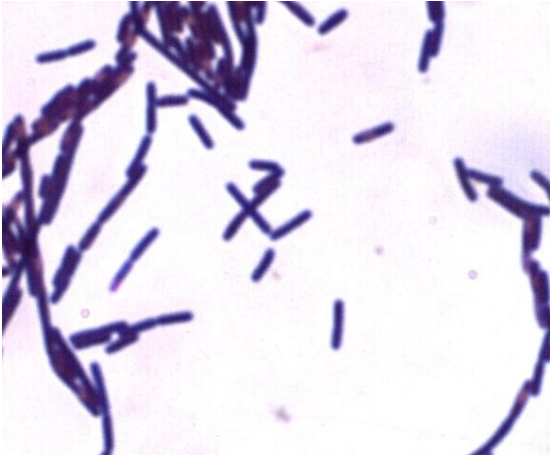
Şekil C. 27. GMBAE 39 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 9. GMBAE 44 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 28. GMBAE 44 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



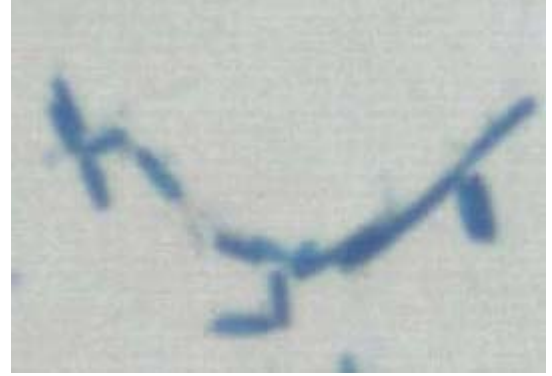
Şekil C. 10. GMBAE 46 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



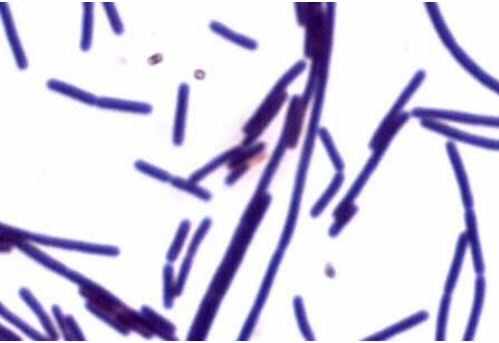
Şekil C. 29. GMBAE 46 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



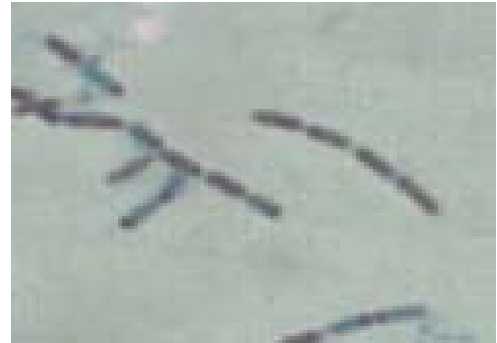
Şekil C. 11. GMBAE 57 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 30. GMBAE 57 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 12. GMBAE 65 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 31. GMBAE 65 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



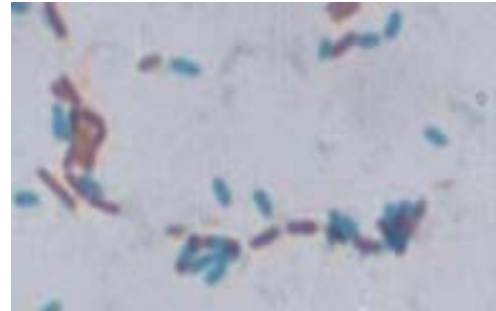
Şekil C. 13. GMBAE 502 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



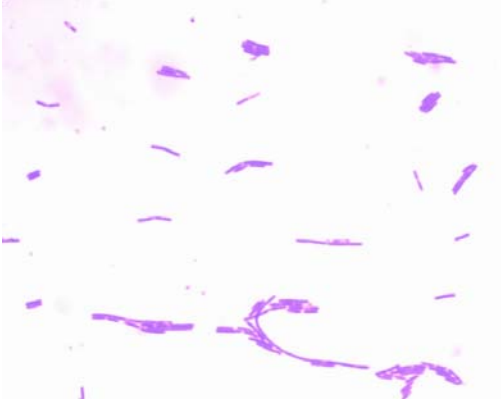
Şekil C. 32. GMBAE 502 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



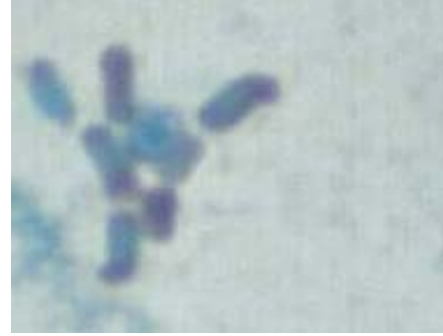
Şekil C. 14. GMBAE 504 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



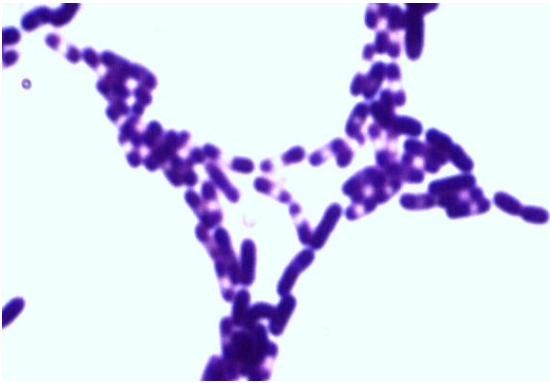
Şekil C. 33. GMBAE 504 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 15. GMBAE 505 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 34. GMBAE 505 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



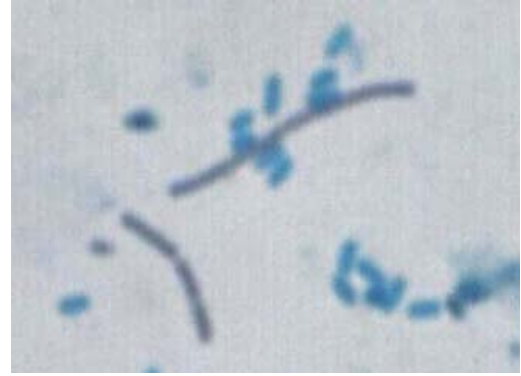
Şekil C. 16. GMBAE 506 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



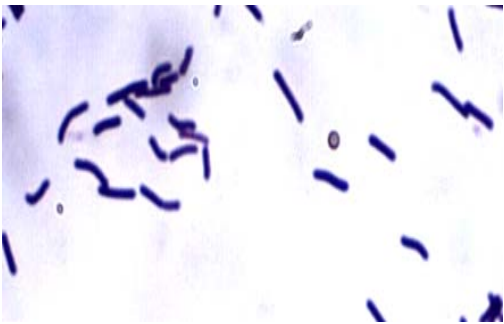
Şekil C. 35. GMBAE 506 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 17. GMBAE 507 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



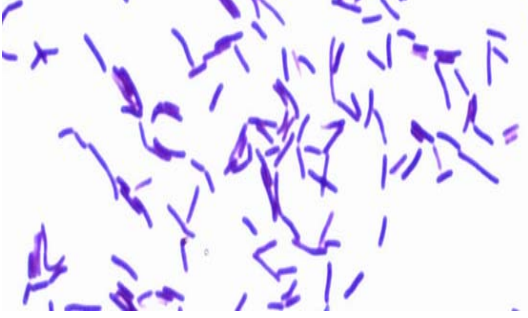
Şekil C. 36. GMBAE 507 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



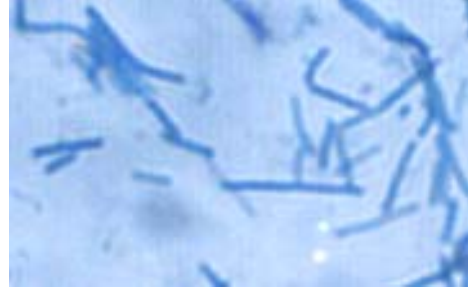
Şekil C. 18. GMBAE 131 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 37. GMBAE 131 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C. 19. GMBAE 132 nolu izolata ait gram boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.



Şekil C.38. GMBAE 132 nolu izolata ait endospor boyamayla hazırlanan preparattan ışık mikroskopunda immersion objektifi ile çekilmiş fotoğrafı x 1750.

EK D. İzolatların Nutrient Agar, TSA ve Üre Agar Üzerindeki Üreme Biçimleri



Şekil D. 1. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 3 nolu İzolat



Şekil D. 20. Tripton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 3 nolu İzolat



Şekil D. 2. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 5 nolu İzolat



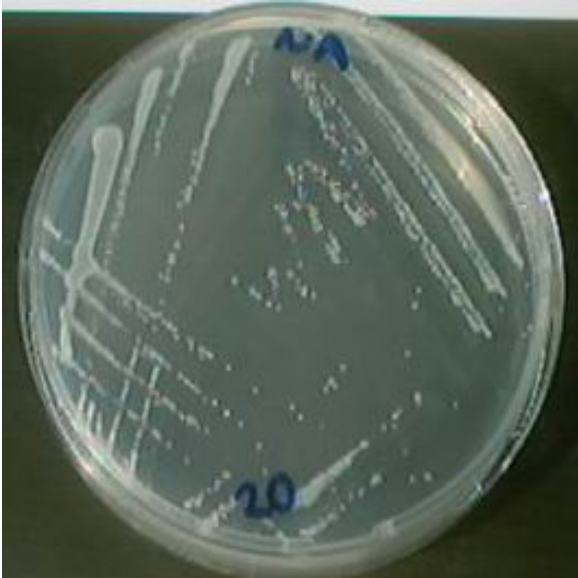
Şekil D. 21. Tripton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 5 nolu İzolat



Şekil D. 3. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE19 nolu İzolat



Şekil D. 22. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 19 nolu İzolat



Şekil D. 4. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 20 nolu İzolat



Şekil D. 23. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 20 nolu İzolat



Şekil D. 5. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 21 nolu İzolat



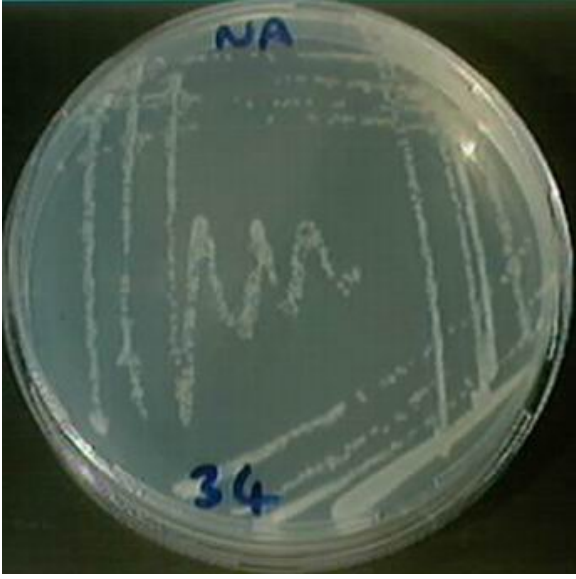
Şekil D. 24. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 21 nolu İzolat



Şekil D. 6. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 22 nolu İzolat



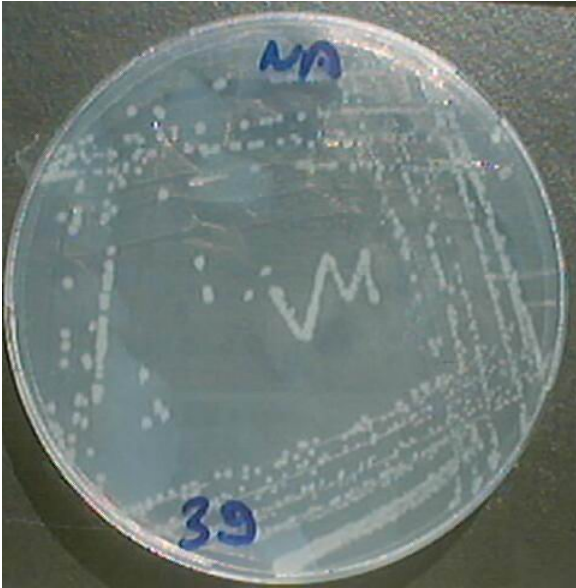
Şekil D. 25. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 22 nolu İzolat



Şekil D. 7. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 34 nolu İzolat



Şekil D. 26. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 34 nolu İzolat



Şekil D. 8. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 39 nolu İzolat



Şekil D. 27. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 39 nolu İzolat



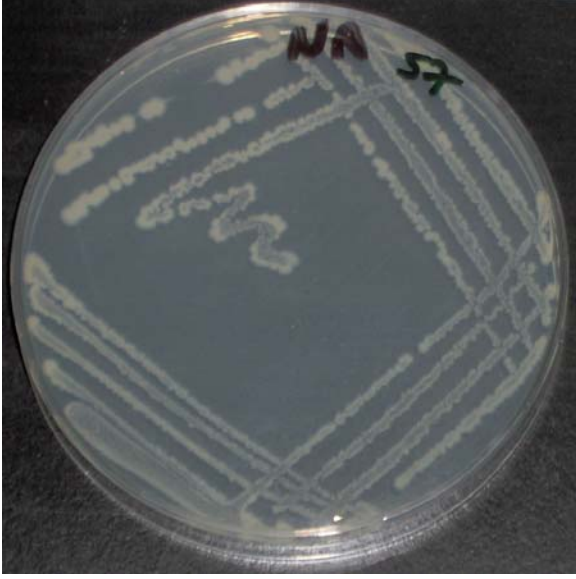
Şekil D. 9. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 44 nolu İzolat



Şekil D. 10. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 46 nolu İzolat



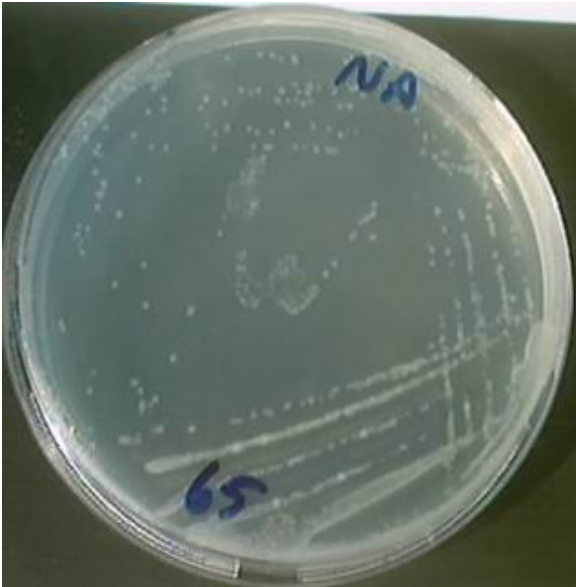
Şekil D. 28. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 46 nolu İzolat



Şekil D. 11. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 57 nolu İzolat



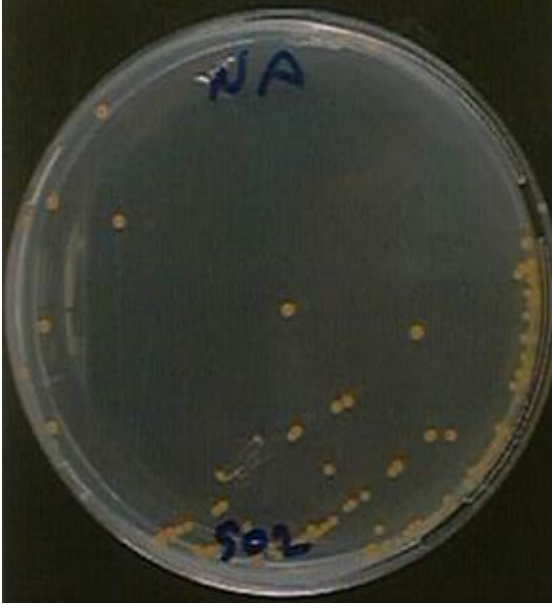
Şekil D. 29. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 57 nolu İzolat



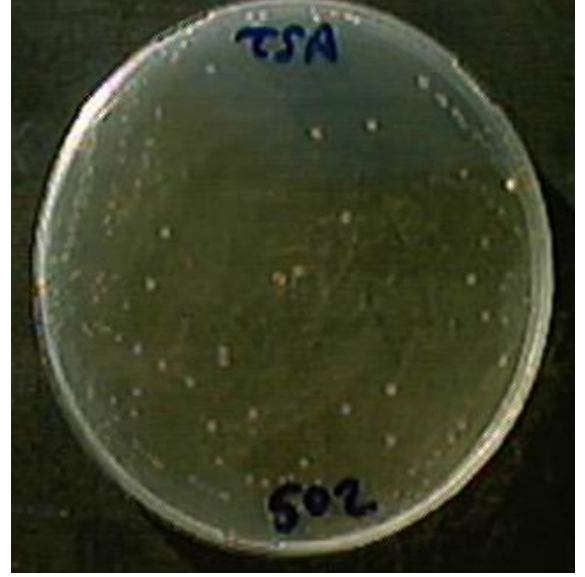
Şekil D. 12. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 65 nolu İzolat



Şekil D. 30. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 65 nolu İzolat



Şekil D. 13. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 502 nolu İzolat



Şekil D. 31. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 502 nolu İzolat



Şekil D. 14. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 504 nolu İzolat



Şekil D. 32. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 504 nolu İzolat



Şekil D. 15. Nutrient Agarlı Besiyerinde GMBAE 505 nolu İzolat



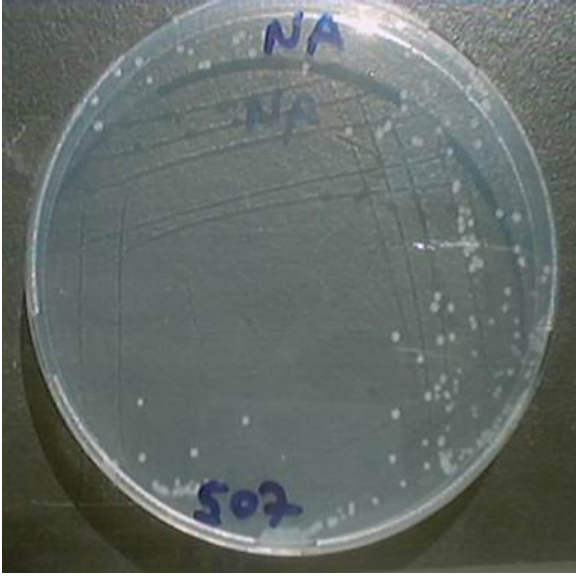
Şekil D. 33. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde GMBAE 505 nolu İzolat



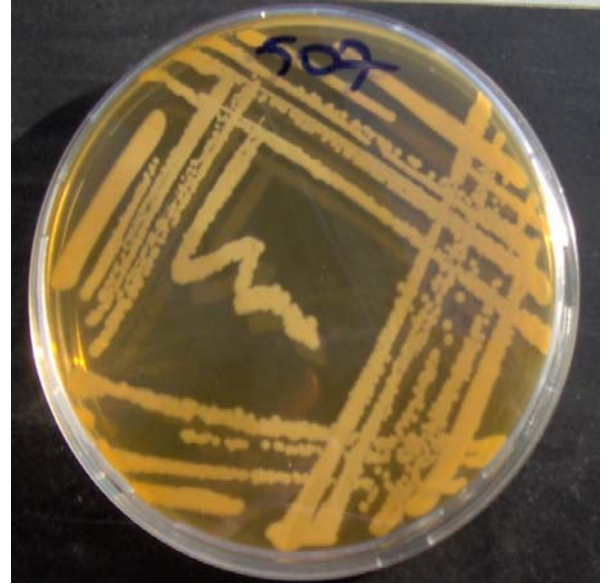
Şekil D. 16. Nutrient Agarlı Besiyerinde GMBAE 506 nolu İzolat



Şekil D. 34. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde GMBAE 506 nolu İzolat



Şekil D. 17. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 507 nolu İzolat



Şekil D. 35. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 507 nolu İzolat



Şekil D. 18. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 131 nolu İzolat



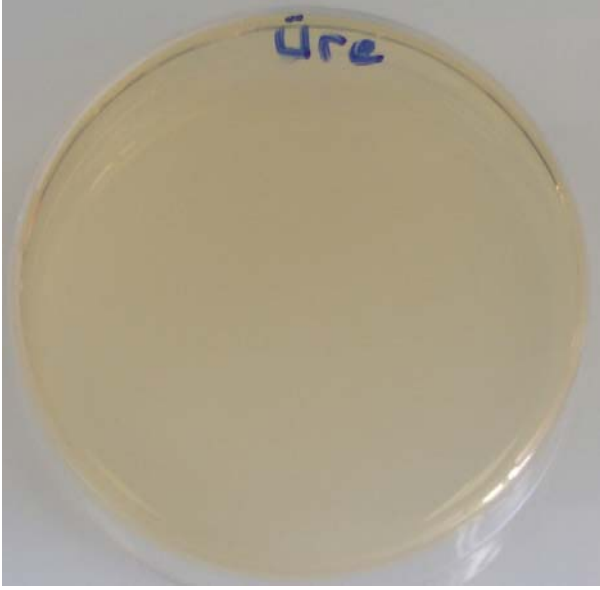
Şekil D. 36. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 131 nolu İzolat



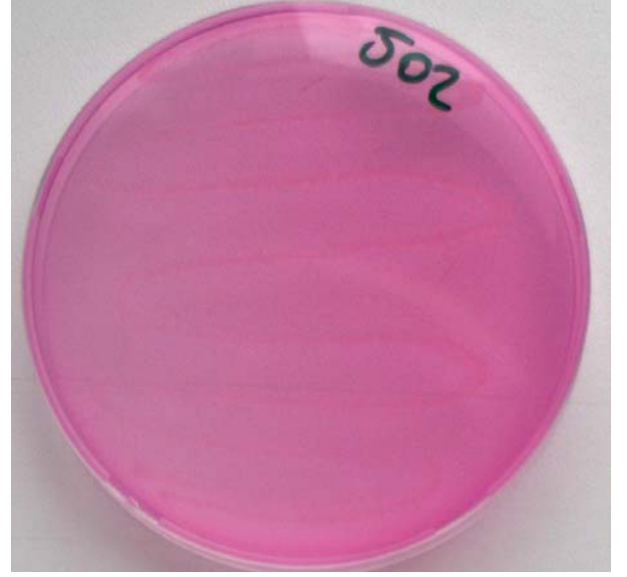
Şekil D. 19. Nutrient Agarlı Besiyerinde
GMBAE 132 nolu İzolat



Şekil D. 37. Trypton Soya Agarlı Besiyerinde
GMBAE 132 nolu İzolat

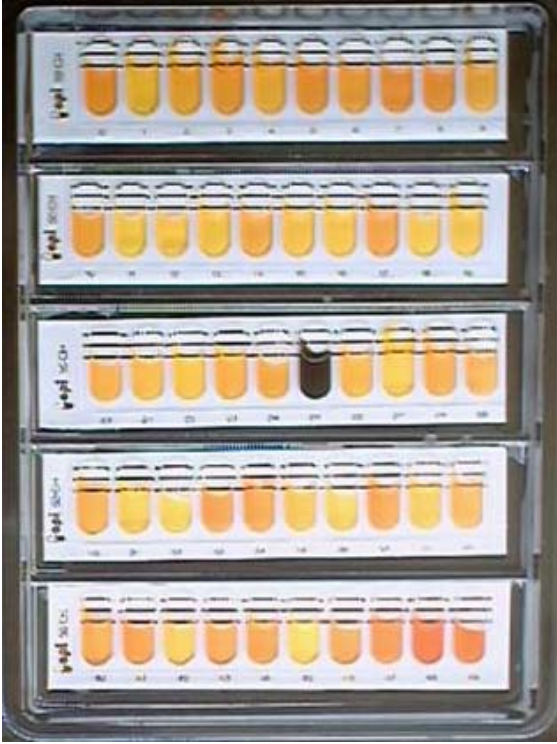


Şekil D. 38. Katı Üre Agarlı Petri

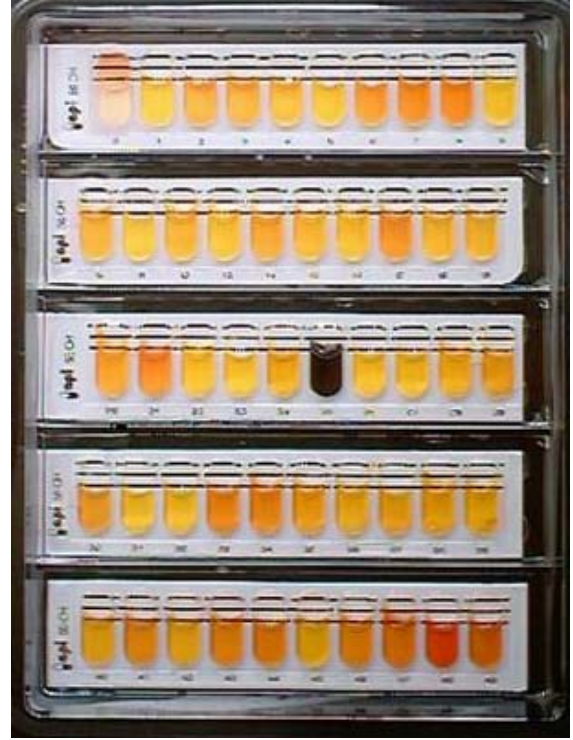


Şekil D. 39. GMB AE 502 nolu İzolatın Katı
Üre agarlı Besiyerinde
Oluşturduğu Koloni

EK E. API 50 CH Testinin 48 Saatlik Sonuçları



Şekil E. 1. GMBAE 21 nolu izolata ait
48 saatlik API 50 CH sonuçları



Şekil E. 2. GMBAE 22 nolu izolata ait
48 saatlik API 50 CH sonuçları



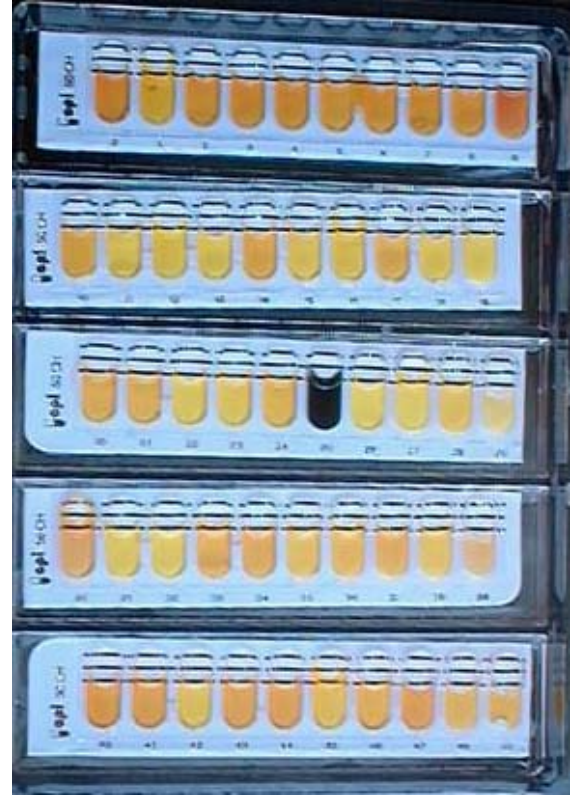
Şekil E. 3. GMBAE 34 nolu izolata ait
48 saatlik API 50 CH sonuçları



Şekil E. 4. GMBAE 39 nolu izolata ait
48 saatlik API 50 CH sonuçları



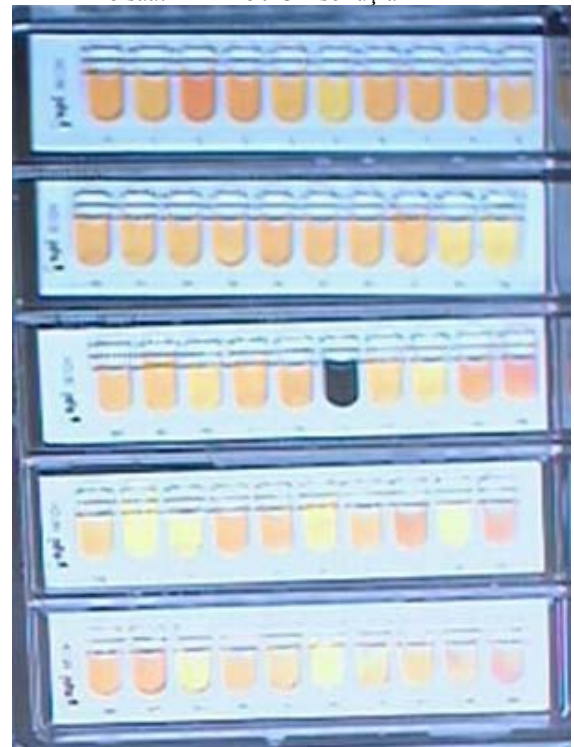
Şekil E. 5. GMBAE 44 nolu izolata ait
48 saatlik API 50 CH sonuçları



Şekil E. 6. GMBAE 57 nolu izolata ait
48 saatlik API 50 CH sonuçları



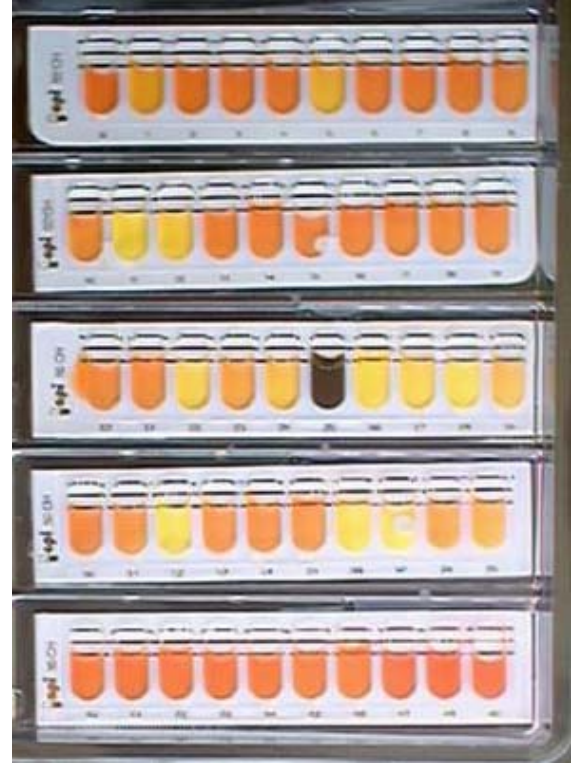
Şekil E. 7. GMBAE 65 nolu izolata ait
48 saatlik API 50 CH sonuçları



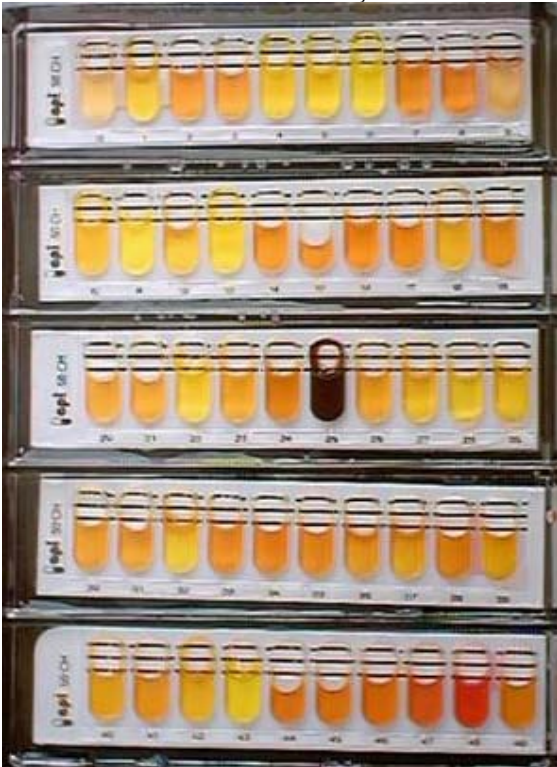
Şekil E. 8. GMBAE 504 nolu izolata ait
48 saatlik API 50 CH sonuçları



Şekil E. 9. GMBAE 505 nolu izolata ait
48 saatlik API 50 CH sonuçları



Şekil E. 10. GMBAE 506 nolu izolata ait
48 saatlik API 50 CH sonuçları



Şekil E. 11. GMBAE 507 nolu izolata ait
48 saatlik API 50 CH sonuçları

EK F. Yağ Asidi Test Sonuçları

E056106.05A [1899] 22

Page 1

Volume: DATA File: E056106.05A Seq Counter: 4 ID Number: 1899
 Type: Samp Bottle: 3 Method: TSBA50
 Created: 10.06.2005 15:48:03
 Sample ID: 22

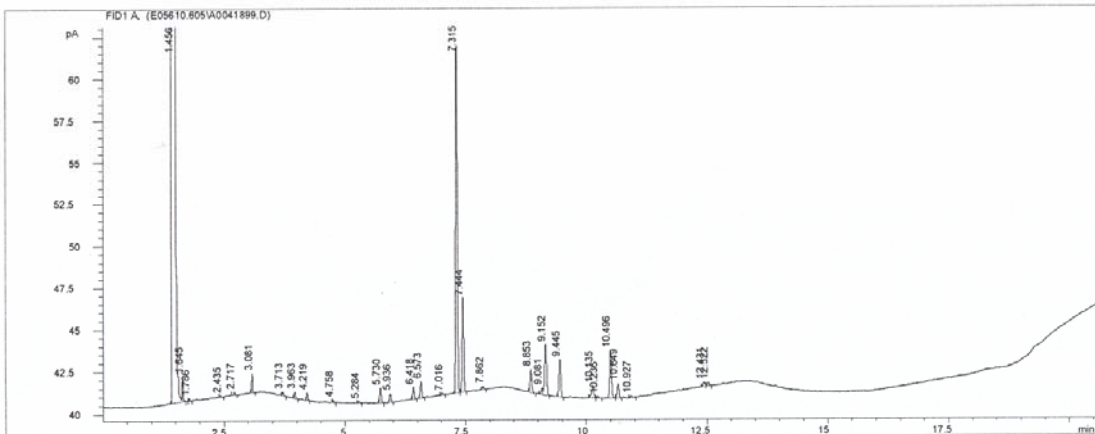
RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.456	4,513E+8	0,026	----	7,055	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,645	4231	0,024	----	7,496		----	< min rt	
1,786	468	0,022	----	7,826		----	< min rt	
2,435	228	0,023	----	9,341		----		
2,717	771	0,029	1,292	9,999	10:0	0,51	ECL deviates -0,001	Reference -0,010
3,081	3556	0,025	1,223	10,608	11:0 ISO	2,22	ECL deviates 0,002	Reference -0,006
3,713	831	0,028	----	11,491		----		
3,963	1527	0,030	1,107	11,800	unknown 11.799	0,86	ECL deviates 0,001	
4,219	1811	0,030	1,084	12,092	11:0 ISO 3OH	1,00	ECL deviates 0,003	
4,758	643	0,027	1,044	12,613	13:0 ISO	0,34	ECL deviates -0,001	Reference -0,007
5,284	530	0,032	1,012	13,101	12:0 ISO 3OH	0,27	ECL deviates 0,003	
5,730	3944	0,036	0,991	13,455	12:0 3OH	1,99	ECL deviates 0,001	
5,936	2284	0,032	0,982	13,618	14:0 ISO	1,14	ECL deviates -0,001	Reference -0,007
6,418	3278	0,033	0,963	14,001	14:0	1,61	ECL deviates 0,001	Reference -0,005
6,573	4687	0,036	0,958	14,109	13:0 ISO 3OH	2,29	ECL deviates 0,000	
7,016	555	0,032	0,944	14,416	15:1 ISO F	0,27	ECL deviates 0,001	
7,315	96442	0,036	0,936	14,623	15:0 ISO	46,04	ECL deviates 0,000	Reference -0,005
7,444	25984	0,037	0,933	14,713	15:0 ANTEISO	12,36	ECL deviates 0,000	Reference -0,006
7,862	926	0,030	0,922	15,002	15:0	----	ECL deviates 0,002	
8,853	6969	0,039	0,904	15,627	16:0 ISO	3,21	ECL deviates 0,000	Reference -0,006
9,081	1896	0,038	0,901	15,771	16:1 w9c	0,87	ECL deviates -0,003	
9,152	15671	0,040	0,900	15,816	Sum In Feature 3	7,19	ECL deviates -0,006	16:1 w7c/15 iso 2OH
9,445	11128	0,039	0,896	16,001	16:0	5,09	ECL deviates 0,001	Reference -0,006
10,135	4921	0,050	0,889	16,414	ISO 17:1 w9c	2,23	ECL deviates -0,002	
10,236	578	0,042	0,888	16,475	Sum In Feature 4	0,26	ECL deviates -0,001	17:1 ISO I/ANTEI B
10,496	14764	0,040	0,886	16,630	17:0 ISO	6,67	ECL deviates 0,000	Reference -0,006
10,649	4623	0,041	0,885	16,722	17:0 ANTEISO	2,09	ECL deviates -0,001	Reference -0,008
10,927	482	0,035	0,883	16,889	17:0 CYCLO	0,22	ECL deviates 0,001	Reference -0,006
12,431	1481	0,039	0,878	17,769	18:1 w9c	0,66	ECL deviates 0,000	
12,522	1325	0,043	0,878	17,822	18:1 w7c	0,59	ECL deviates -0,001	
----	15671	----	----	----	Summed Feature 3	7,19	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c
----	578	----	----	----	Summed Feature 4	0,26	17:1 ISO I/ANTEI B	17:1 ANTEISO B/i 1

ECL Deviation: 0,002
 Total Response: 210907
 Percent Named: 99.50%

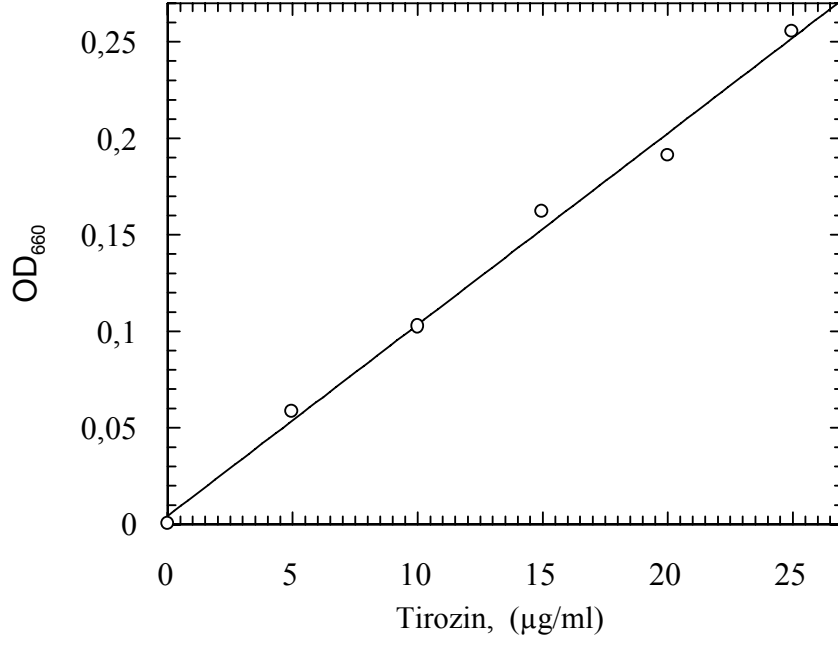
Reference ECL Shift: 0,007 Number Reference Peaks: 12
 Total Named: 209848
 Total Amount: 196900

E056106.05A [1899] 22

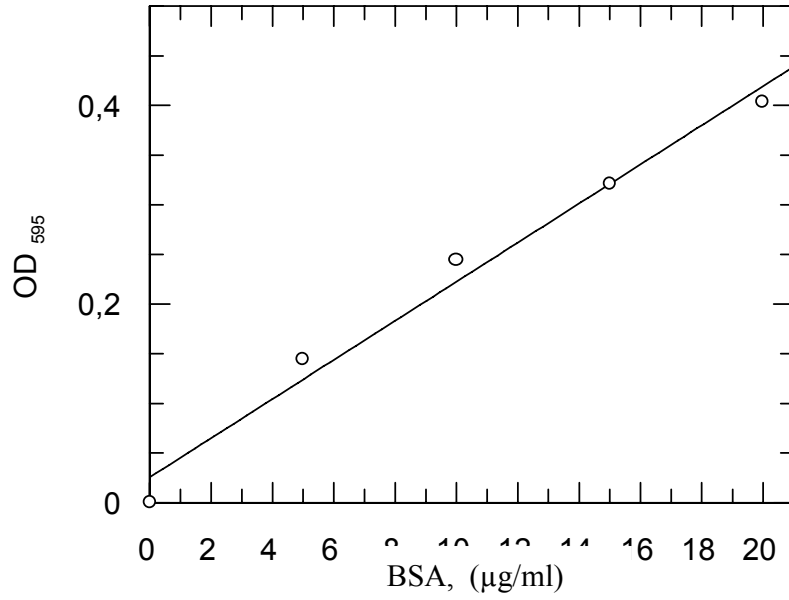
Page 2



EK H. Alkalen Proteaz Aktivitesi ve Protein Miktarı Tayini İçin Standart Grafikleri



Şekil H.1. Tirozin Standart Eğrisi (Korelasyon Katsayısı: 0,9969)



Şekil H.2. Protein standart Eğrisi (Korelasyon Katsayısı: (r) = 0.991)

EK I. 1. Blast Tarama Sonuçları

BLASTN 2.2.10 [Oct-19-2004]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1118322787-3391-91176705048.BLASTQ1

Query=

(1484 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS,

GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

3,181,128 sequences; 14,197,554,961 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

			Score
Sequences producing significant alignments:			
(Bits)			
gi 59276002 dbj AB201798.1 	Bacillus clausii gene for 16S rRN...		2500
gi 59275998 dbj AB201794.1 	Bacillus clausii gene for 16S rRN...		2500
gi 498800 emb X76440.1 BS16SRR03	Bacillus clausii DSM 8716, 16S		2456
gi 59276000 dbj AB201796.1 	Bacillus clausii gene for 16S rRN...		2438
gi 59275996 dbj AB201792.1 	Bacillus clausii gene for 16S rRN...		2438
gi 56908016 dbj AP006627.1 	Bacillus clausii KSM-K16 DNA, comple		2438
gi 11414972 dbj AB043859.1 	Bacillus sp. H167 gene for 16S rRNA		2434
gi 62177691 gb AY960116.1 	Bacillus clausii strain XJU-3 16S ...		2430

<u>gi 62005124 gb AY959330.1 </u>	Bacillus clausii strain XJU-5 16S ...	<u>2430</u>
<u>gi 62005123 gb AY959329.1 </u>	Bacillus clausii strain XJU-4 16S ...	<u>2430</u>
<u>gi 12698849 gb AF329475.1 AF329475</u>	Bacillus clausii strain LM...	<u>2430</u>
<u>gi 59276004 dbj AB201800.1 </u>	Bacillus clausii gene for 16S rRN...	<u>2422</u>
<u>gi 59276001 dbj AB201797.1 </u>	Bacillus clausii gene for 16S rRN...	<u>2422</u>
<u>gi 59275997 dbj AB201793.1 </u>	Bacillus clausii gene for 16S rRN...	<u>2422</u>
<u>gi 9715774 emb AJ297498.1 BCL297498</u>	Bacillus clausii 16S rRNA ge	<u>2422</u>
<u>gi 9715771 emb AJ297497.1 BCL297497</u>	Bacillus clausii 16S rRNA ge	<u>2422</u>
<u>gi 9715768 emb AJ297496.1 BCL297496</u>	Bacillus clausii 16S rRNA ge	<u>2422</u>
<u>gi 9715765 emb AJ297495.1 BCL297495</u>	Bacillus clausii 16S rRNA ge	<u>2422</u>
<u>gi 9715764 emb AJ297494.1 BCL297494</u>	Bacillus clausii 16S rRNA ge	<u>2422</u>
<u>gi 9715763 emb AJ297493.1 BCL297493</u>	Bacillus clausii 16S rRNA ge	<u>2422</u>
<u>gi 9715761 emb AJ297492.1 BCL297492</u>	Bacillus clausii 16S rRNA ge	<u>2422</u>
<u>gi 9715758 emb AJ297491.1 BCL297491</u>	Bacillus clausii 16S rRNA ge	<u>2422</u>
<u>gi 12698848 gb AF329474.1 AF329474</u>	Bacillus clausii strain LM...	<u>2420</u>
<u>gi 11414968 dbj AB043855.1 </u>	Bacillus sp. IC gene for 16S rRNA	<u>2418</u>
<u>gi 11414966 dbj AB043853.1 </u>	Bacillus sp. 0-4 gene for 16S rRNA	<u>2407</u>
<u>gi 59276005 dbj AB201801.1 </u>	Bacillus clausii gene for 16S rRN...	<u>2403</u>
<u>gi 17978832 gb AY066000.1 </u>	Bacillus clausii strain za-w-3 16S...	<u>2401</u>
<u>gi 25527840 gb AY152839.1 </u>	Bacillus clausii strain GMBAE 42 1...	<u>2375</u>
<u>gi 39573582 dbj AB111935.1 </u>	Bacillus clausii gene for 16S rib...	<u>2339</u>
<u>gi 9622350 gb AF172603.1 AF172603</u>	Bacillus clausii 16S ribosomal	<u>2325</u>
<u>gi 4959963 gb AF142576.1 AF142576</u>	Bacillus sp. Enterogermina ...	<u>2321</u>
<u>gi 9622373 gb AF172997.1 AF172997</u>	Bacillus clausii 16S ribosomal	<u>2294</u>
<u>gi 5852802 gb AF137020.1 AF137020</u>	Bacillus sp. WW3-SN6 16S ribos	<u>2103</u>
<u>gi 59799622 gb AY912087.1 </u>	Bacillus sp. M18 16S ribosomal RNA ge	<u>2044</u>
<u>gi 27530895 dbj AB098576.1 </u>	Bacillus sp. TUT1007 gene for 16S rR	<u>1927</u>
<u>gi 498798 emb X76438.1 BS16SRR01</u>	Bacillus sp. (DSM 8714) gene fo	<u>1923</u>
<u>gi 38374132 gb AY258614.2 </u>	Bacillus patagoniensis strain PAT ...	<u>1877</u>
<u>gi 18996250 emb AJ431332.1 BSP431332</u>	Bacillus sp. ikaite 27 part	<u>1873</u>
<u>gi 59799623 gb AY912088.1 </u>	Bacillus sp. M19 16S ribosomal RNA ge	<u>1869</u>
<u>gi 52630977 gb AY737309.1 </u>	Bacillus gibsonii strain S-2 16S r...	<u>1853</u>
<u>gi 498795 emb X76436.1 BA16SRRX</u>	B.alcalophilus (DSM 485 T) gene	<u>1850</u>
<u>gi 498808 emb X76448.1 BS16SRR11</u>	Bacillus sp. (DSM 8724) gene fo	<u>1848</u>
<u>gi 498806 emb X76446.1 BS16SRR09</u>	Bacillus gibsonii DSM 8722, 16S	<u>1840</u>
<u>gi 498809 emb X76449.1 BS16SRR12</u>	Bacillus pseudalcaliphilus DSM	<u>1838</u>
<u>gi 60417428 emb AJ880003.1 </u>	Bacillus gibsonii partial 16S rRNA g	<u>1830</u>
<u>gi 19069508 emb AJ316316.1 BSP316316</u>	Bacillus sp. LMG 21005 part	<u>1830</u>
<u>gi 59896024 gb AY914067.1 </u>	Bacillus sp. A-5B 16S ribosomal RNA g	<u>1820</u>

gi 11414954 dbj AB043841.1 	Bacillus sp. 169 gene for 16S rRNA	1814
gi 27497635 gb AY167815.1 	Bacillus gibsonii strain SAFN-015 ...	1812
gi 59896023 gb AY914066.1 	Bacillus sp. A-5A 16S ribosomal RNA g	1806
gi 11414961 dbj AB043848.1 	Bacillus sp. C-59-2 gene for 16S rRN	1798
gi 11414953 dbj AB043840.1 	Bacillus sp. 135 gene for 16S rRNA	1790
gi 47847536 dbj AB111933.2 	Bacillus gibsonii gene for 16S ri...	1788
gi 59799626 gb AY912091.1 	Bacillus sp. M6 16S ribosomal RNA gen	1784
gi 39321 emb X60603.1 BALC16S	B.alcalophilus 16S ribosomal RNA	1768
gi 33392154 gb AY345477.1 	Bacterium K30 16S ribosomal RNA gene,	1758
gi 34809235 gb AY376312.1 	Bacillus bogoriensis strain LBB3 1...	1744
gi 61657985 gb AY946022.1 	Bacillus clausii strain M7 16S rib...	1729
gi 51699403 dbj AB167010.1 	Bacillus sp. NT N86 gene for 16S rRN	1705
gi 29501660 gb AY228462.1 	Bacillus sp. KMM 3737 16S ribosomal R	1701
gi 27807581 dbj AB094471.1 	Bacillus sp. 2216.25.2 gene for 16S	1687
gi 33392125 gb AY345448.1 	Bacterium KA40 16S ribosomal RNA gene	1681
gi 26801202 emb AJ532701.1 UBA532701	Uncultured bacterium partia	1677
gi 53749067 dbj AB191344.1 	Filobacillus sp. RF2-5 gene for 16S	1628
gi 12049572 emb AJ277904.1 BAL277904	Bacillus alcalophilus 16...	1588
gi 1418398 emb X92164.1 BSPRRWE1	Bacterial sp. 16S rRNA gene (La	1566
gi 22798967 emb AJ507321.1 BSP507321	Bacillus sp. NER 16S rRNA g	1550
gi 498801 emb X76441.1 BS16SRR04	Bacillus sp. (DSM 8717) gene fo	1550
gi 63034010 gb AY793550.2 	Bacillus sp. MLB-2 16S ribosomal RNA	1550
gi 11414956 dbj AB043843.1 	Bacillus sp. 17-1 gene for 16S rRNA	1550
gi 55774416 gb AY754340.1 	Bacillus sp. G1 16S ribosomal RNA gen	1542
gi 53830775 gb AY751538.1 	Bacillus sp. TS1-1 16S ribosomal RNA	1542
gi 51968309 dbj AB188090.1 	Bacillus oshimensis gene for 16S ...	1542
gi 11414963 dbj AB043850.1 	Bacillus sp. K12-5 gene for 16S rRNA	1542
gi 11414952 dbj AB043839.1 	Bacillus sp. 13 gene for 16S rRNA	1542
gi 55167416 dbj AB194046.1 	Filobacillus salipiscarius gene f...	1505
gi 34525928 emb AJ582202.1 UFI582202	Uncultured firmicute partia	1501
gi 47847535 dbj AB111932.2 	Bacillus sp. T31 gene for 16S rib...	1483
gi 1418354 emb X92163.1 BSPRR103N	Bacterial sp. 16S rRNA gene (L	1479
gi 4038083 gb AF064705.1 	Bacillus arseniciselenatis 16S ribo...	1439
gi 30143054 gb AY192145.1 	Bacillus clausii strain I-58 16S r...	1362
gi 9622522 gb AF173168.1 AF173168	Bacillus clausii 16S ribosomal	1344
gi 39573629 dbj AB112011.1 	Bacillus clausii gene for 16S rib...	1336
gi 39573605 dbj AB111987.1 	Uncultured Bacillaceae bacterium ...	1336
gi 39573613 dbj AB111995.1 	Uncultured Bacillaceae bacterium ...	1328
gi 46237488 emb AJ634661.1 	Sporolactobacillus kofuensis gene...	1249

<u>gi 457669 dbj D16287.1 SP016SRR22</u>	Sporolactobacillus laevas 16S	<u>1249</u>
<u>gi 457651 dbj D16274.1 BAC16SRR09</u>	Bacillus myxolacticus 16S rRNA	<u>1249</u>
<u>gi 27818785 gb AY179186.1 </u>	Bacillus clausii clone ALK-7 16S r...	<u>1247</u>
<u>gi 457646 dbj D16269.1 BAC16SRR04</u>	Bacillus laevolacticus 16S rRN	<u>1241</u>
<u>gi 457668 dbj D16286.1 SP016SRR21</u>	Sporolactobacillus laevis 16S	<u>1229</u>
<u>gi 457667 dbj D16285.1 SP016SRR20</u>	Sporolactobacillus laevis 16S	<u>1229</u>
<u>gi 46848192 emb AJ634663.2 </u>	Sporolactobacillus nakayamae subs...	<u>1227</u>
<u>gi 62420328 gb AY925091.1 </u>	Sporolactobacillus sp. FRB2 16S ri...	<u>1227</u>
<u>gi 457673 dbj D16291.1 SP016SRR26</u>	Sporolactobacillus racemicus 1	<u>1227</u>
<u>gi 30088833 gb AY241449.1 </u>	Bacillus sp. UST020129-009 16S rib...	<u>1219</u>
<u>gi 457672 dbj D16290.1 SP016SRR25</u>	Sporolactobacillus racemicus 1	<u>1219</u>
<u>gi 457671 dbj D16289.1 SP016SRR24</u>	Sporolactobacillus racemicus 1	<u>1219</u>
<u>gi 28190000 dbj AB101595.1 </u>	Sporolactobacillus inulinus gene for	<u>1217</u>
<u>gi 457670 dbj D16288.1 SP016SRR23</u>	Sporolactobacillus laevas 16S	<u>1217</u>

EK I. 2 . *Bacillus clausii* GMBAE 22 16S rRNA Dizisi

NCBI Accession Numarası: DQ131908

DQ131908. Reports *Bacillus clausii* ...[gi:71845201]

LOCUS DQ131908 1483 bp DNA linear BCT 10-AUG-2005
DEFINITION *Bacillus clausii* strain GMBAE 22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION DQ131908
VERSION DQ131908.1 GI:71845201
KEYWORDS .
SOURCE *Bacillus clausii*
ORGANISM *Bacillus clausii*
Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1483)
AUTHORS Bal,H., Denizci,A.A., Erarslan,A. and Kazan,D.
TITLE *Bacillus clausii* GMBAE 22 alkaline protease producer
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1483)
AUTHORS Denizci,A.A., Kazan,D., Erarslan,A. and Bal,H.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (15-JUL-2005) Microbial Biotechnology, Research Institute
for Genetic Engineering and Biotechnology, Anibal Caddesi, Kocaeli 41470, Turkey
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1483
/organism="Bacillus clausii"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="GMBAE 22"
/db_xref="taxon:79880"
rRNA <1..>1483
/product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gcgtcctata catgcaagtc gagcggacat tataaggagc ttgctccttt
gacgttagcg
61 gcggacgggt gagtaacacg tgggcaacct gccccttaga ctgggataac
tccgggaaac
121 cggagctaat accggataat ccctttctcc acctggagag aggggtgaaag
atggcttcgg
181 ctatcactaa gggatgggcc cgcggcgcac tagctagttg gtaaggtaac
ggcttaccaa
241 ggcaacgatg cgtagccgac ctgagagggg gatcggccac actgggactg
agacacggcc
301 cagactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttccgcaa tggacgaaag
tctgacggag
361 caacgccgcg tgagttagga aggccttcgg gtcgtaaagc tctgttgtga
gggaagaagc
421 ggtaccgttc gaatagggcg gtncttgac ggtacctcac cagaaagcca
cggctaacta
481 cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgttg tccggaatta
ttgggcgtaa
541 agcgcgcgca ggcggcttct taagtctgat gtgaaatctc ggggctcaac
cccagcggc

601 cattggaaac tggggagctt gagtgcagaa gaggagagtg gaattccacg
 tgtagcgggtg
 661 aaatgcgtag agatgtggag gaacaccagt ggcgaaggcg actctctggt
 ctgtaactga
 721 cgctgaggcg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag
 tccacgccgt
 781 aaacgatgag tgctaggtgt taggggtttc gatgcccgta gtgccnaant
 taacacatta
 841 agcactcccc ctggggagta cggccgcaag gctgaaactc aaaggaattg
 acggggaccc
 901 gcacaagcag tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt
 accaggtctt
 961 gacatccttt gaccacccaa gagattgggc ttccccttcg ggggcaaagt
 gacaggtggt
 1021 gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa
 cgagcgcaac
 1081 ccttgatctt agttgccagc attgagttgg gnactctaag gtgantgcng
 gtgacaaaacn
 1141 ngagggaagnt ggggatgacg tnaantnatn atnncctnta tgacntgggc
 tacacacgtg
 1201 ttncaatgga tgntncaaag ggcagcgaaa ccgngagggtg aagccaatnc
 cataaagcca
 1261 ttntcagttc ggattgcagg ctgcaactcg cttgcatgaa nctggaattc
 atagtaatcg
 1321 tggatcagca tgntngcggg gaatatgttc ccgggtcttg tacacacngc
 cgngtcacac
 1381 catcgagagt ttgtaacacc cgaatgtcgg tgaggcaacc ttttggaacc
 agccgtcata
 1441 agnggggaca anngacatgg ggtgangtct acnaagnttc ncg

EK J MASCOT Tarama Sonuçları



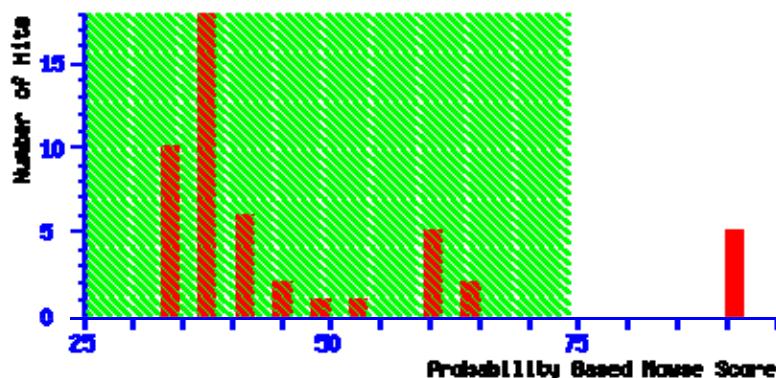
Mascot Search Results

User : Dilek Kazan
Email : dkazan@eng.marmara.edu.tr
Search title : alkaline protease
Database : NCBI nr 20051210 (3093834 sequences; 1063507484 residues)
Taxonomy : Bacteria (Eubacteria) (1346575 sequences)
Timestamp : 13 Dec 2005 at 09:42:29 GMT
Top Score : 91 for gi|6137335, Chain A, Bacillus Lentus Subtilisin (Ser 87) N76dS103AV104I

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 74 are significant ($p < 0.05$).



	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi 6137335	26721	91	Chain A, Bacillus Lentus Subtilisin (Ser 87) N76dS103AV104I
2.	gi 14278487	26749	91	Chain A, Structure On Native (Asn 87) Subtilisin From Bacillus Lentus
3.	gi 47168367	26710	91	Chain A, Bacillus Lentus Subtilisin Variant S101gV104N
4.	gi 3114348	26725	91	Serine Protease Pb92 From Bacillus Alkalophilus, Nmr, 18 Structures
5.	gi 267048	26698	91	Subtilisin Savinase (Alkaline protease)

22

Detector Voltage =1900

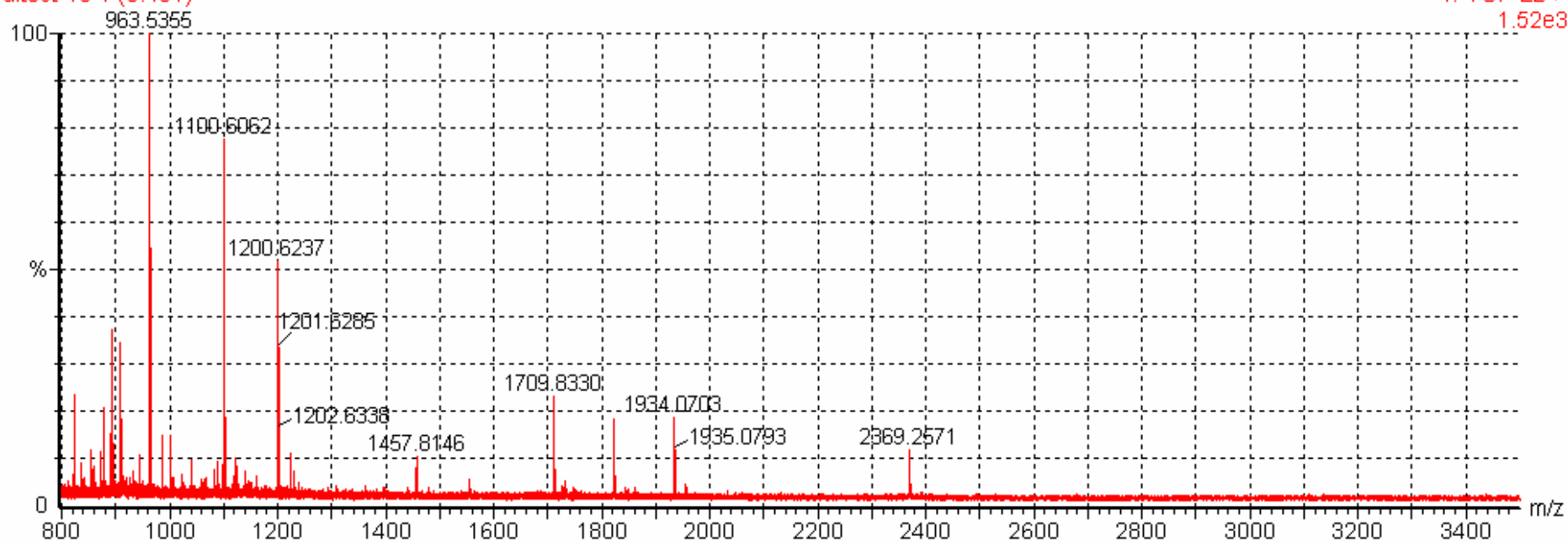
Pulse Voltage=3200

Laser Energy=25

1: TOF LD+

1.52e3

altest-10 1 (0.401)



Results List

5. [gi|267048](#) Mass: 26698 Score: 91 Expect: 0.0012 Queries matched: 17
Subtilisin Savinase (Alkaline protease)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
963.5355	962.5276	963.0520	-0.5245	11	- 19	0	R.VQAPAAHNR.G
1100.5616	1099.5537	1100.2278	-0.6741	1	- 10	0	-.AQSVPWGISR.V
1100.6062	1099.5983	1100.2278	-0.6295	1	- 10	0	-.AQSVPWGISR.V
1200.6237	1199.6158	1200.3038	-0.6880	232	- 241	0	K.NPSWSNVQIR.N
1200.8003	1199.7924	1200.3038	-0.5114	232	- 241	0	K.NPSWSNVQIR.N
1201.6052	1200.5973	1200.3038	0.2935	232	- 241	0	K.NPSWSNVQIR.N
1456.7849	1455.7770	1456.6053	-0.8283	230	- 241	1	K.QKNPSWSNVQIR.N
1457.8146	1456.8067	1456.6053	0.2014	230	- 241	1	K.QKNPSWSNVQIR.N
1457.8146	1456.8067	1456.6053	0.2014	230	- 241	1	K.QKNPSWSNVQIR.N
1709.8051	1708.7972	1709.7952	-0.9981	165	- 180	0	R.YANAMAVGATDQNNNR.A
1709.8330	1708.8251	1709.7952	-0.9702	165	- 180	0	R.YANAMAVGATDQNNNR.A
1934.0409	1933.0330	1933.1265	-0.0936	144	- 164	0	R.GVLVVAASGNSGAGSISYPAR.Y
1934.0703	1933.0624	1933.1265	-0.0642	144	- 164	0	R.GVLVVAASGNSGAGSISYPAR.Y
1935.0497	1934.0418	1933.1265	0.9152	144	- 164	0	R.GVLVVAASGNSGAGSISYPAR.Y
2369.1914	2368.1835	2368.5129	-0.3294	246	- 269	0	K.NTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR.-
2369.2571	2368.2492	2368.5129	-0.2637	246	- 269	0	K.NTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR.-
2370.1770	2369.1691	2368.5129	0.6562	246	- 269	0	K.NTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR.-

No match to: 1202.6338, 1821.0125

Search Parameters

Type of search : Peptide Mass Fingerprint
Enzyme : Trypsin
Mass values : Average
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 1 Da
Peptide Charge State : 1+
Max Missed Cleavages : 1
Number of queries : 19

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Number of mass values searched: 19
Number of mass values matched: 17
Sequence Coverage: 34%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 **AQSVPWGISR** VQAPAAHNRG LTGSGVKVAV LDTGISTHPD LNIRGGASFV
51 PGEPSTQDGN GHGTHVAGTI AALNNSIGVL GVAPSAELYA VKVLGASGSG
101 SVSSIAQGLE WAGNNGMHVA NLSLGSPSPS ATLEQAVNSA **TSRGVLVVA**
151 **SGNSGAGSIS** YPARYANAMA **VGATDQNNNR** ASFSQYGAGL DIVAPGVNVQ
201 STYPGSTYAS LNGTSMATPH VAGAAALVKQ **KNPSWSNVQI** RNHLKNTATS
251 LGSTNLYGSG LVNAEAAT

ÖZGEÇMİŞ

1967 Şanlıurfa’ da doğmuştur. İlk, orta ve lise öğrenimini Türkiye’ nin farklı illerinde tamamladıktan sonra 1988 yılında Gazi Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümünü bitirmiştir. 1990-1995 yılları arasında Milli Eğitim Bakanlığı’ nın öğretmeni olarak İstanbul’ da Biyoloji Öğretmenliği yapmıştır. 1995 yılında Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’ nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başlamıştır. 1998 yılında Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji programında Yüksek Lisansını tamamlamıştır. 2000 yılında Marmara Üniversitesi , Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji programında Doktora yapmaya başlamıştır.

KATILDIĞI KONGRELER

1- 4.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi,1998, Diyarbakır

Sözlü Sunu : “ Azaserin enjekte edilmiş sıçanların karaciğer hücrelerinde prekanseröz lezyonların ışık mikroskopunda incelenmesi”

2- 13th Balkan Biochemical Biophysical Days & Meeting on Metabolic Disorders,12-15 October 2003, Kuşadası / TURKEY

Poster Sunu: “The Investigation of the Phenotypic Properties of Bacterial Cultures Isolated from Local Ecosystems able to Produce Industrially Important Enzymes”

YAYINLARI:

- 1- 4.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Bildiriler kitabı (Sayfa:33), 1998
- 2- 13th Balkan Biochemical Biophysical Days & Meeting on Metabolic Disorders, 12-15 October 2003, Bildiriler Kitabı Vol:28, Sayı:3, Page:143