

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİYADİN (AĞRI) SICAK SU KAYNAKLARINDAN
BAKTERİ İZOLASYONU VE BAZI
ENZİMLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR**

Fatma MATPAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
TEMMUZ-2007**

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DIYARBAKIR

Fatma MATPAN tarafından yapılan "Diyadin (Ağrı) Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu ve Bazı Enzimleri Üzerinde Çalışmalar" konulu bu çalışma , jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı

Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Kemal GÜVEN

Üye : Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Sema FİNCAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 25/07/2007

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2006

Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇÇİOĞLU

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
AMAÇ.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Canlıların Sistematiği.....	1
1.2. Bakterilerin Sınıflandırılması.....	2
1.2.1. Bakteriyel Sınıflandırmanın Tarihçesi.....	2
1.2.2. Doğal (filojenik) Klasifikasyon.....	3
1.2.3. Numerikal Klasifikasyon.....	4
1.2.4. Genetik Klasifikasyon.....	4
1.2.5. Antijenik Klasifikasyon.....	4
1.2.6. Fajla Tiplendirme.....	4
1.3. Gram Pozitif Spor Oluşturan Basiller.....	5
1.3.1. <i>Basillus</i> Cinsi Bakteriler.....	7
1.4. Biyoteknoloji.....	10
1.4.1. Mikroorganizmaların Biyoteknolojide Kullanımı.....	10
1.4.2. Termofil Mikroorganizmaların Biyoteknolojide Kullanımı.....	11
1.4.3. Enzimler.....	12
1.4.3.1. Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler.....	12
1.5. Amilazlar.....	15
1.5.1. Nişastayı Hidrolizleyen Başlıca Enzimler.....	15
1.5.2. Termostabil Amilazlar.....	15
1.5.3. Amilazın Biyoteknolojide Kullanım Alanları.....	16
1.5.4. Nişasta.....	18
1.5.5. α -Amilazın Etki Mekanizması.....	19
1.6. Proteazlar.....	20
1.6.1. Proteazların Biyoteknolojide Kullanım Alanları.....	20
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	22
3. MATERYAL VE METOD.....	28

3.1. Biyolojik Materyal.....	28
3.2. Kimyasal Maddeler.....	31
3.3. Besi Yerleri.....	31
3.3.1. Sıvı Besi Yeri (Nutrient Broth [NB]).....	31
3.3.2. Katı Besi Yeri	31
3.4. Tamponlar	31
3.5. Boya Maddeleri.....	31
3.6. Kullanılan Aletler	32
3.7. Bakteri İzolasyon işlemi ve Saf Kültür Bakteri Üretimi.....	32
3.8. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması.....	33
3.9. Sıcaklığın Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	33
3.10. pH'nın Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	33
3.11. Gram Boyama.....	33
3.12. Spor Boyama.....	34
3.13. Biyokimyasal Testler.....	34
3.13.1. Nişasta Hidrolizi Testi.....	34
3.13.2. Jelatin Hidrolizasyon Testi.....	34
3.13.3. Katalaz Testi.....	35
3.13.4. Kazein Hidrolizi.....	35
3.13.5. Üreaz Testi.....	35
3.13.6. Lipaz Testi.....	35
3.14. Hareket Testi.....	36
3.15. Antibiyotiklere Karşı Duyarlılık Testi.....	36
3.16. Enzim Aktivite Tayinleri.....	36
3.16.1. Amilaz Enzimi Aktivite Tayini (Bernfeld Yöntemi, 1955)..	36
3.16.2. Proteaz Enzimi Aktivite Tayini (Leighton ve ark., 1973).....	37
3.17. Amilaz ve Proteaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Etkisi.....	37

3.18. Amilaz ve Proteaz Enzimleri Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	38
3.19. Amilaz ve Proteaz Enzimleri Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	38
3.20. Protein Miktar Tayini (Lowry Yöntemi, 1951).....	38
3.21. Çöktürme ve Diyaliz.....	39
3.22. Amilaz ve Proteaz Enzimleri Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi.....	39
3.23. Elektroforez.....	40
3.23.1. Nondenatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Laemmli, 1977).....	40
3.23.2. Jelin Hazırlanması.....	40
3.23.3. Elektroforez İşlemi.....	41
4.BULGULAR.....	42
4.1. İzolasyon İşlemi.....	42
4.2. Bakterilerin Gram Boyama Özellikleri.....	42
4.3. Bakterilerin Spor Boyama Özellikleri.....	43
4.4. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisi.....	44
4.5. Sıcaklığın Mikroorganizmaların Üremesi Üzerine Etkisi.....	46
4.6. pH'nın Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisi.....	47
4.7. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler.....	49
4.7.1. Nişasta Hidrolizi Testi.....	50
4.7.2. Jelatin Hidroliz Testi.....	51
4.7.3. Katalaz Testi.....	51
4.7.4. Kazein Hidroliz Testi.....	52
4.7.5. Üreaz Testi.....	53
4.7.6. Lipaz Testi.....	55
4.7.7. Hareket Testi.....	56
4.7.8. Antibiyotiklere Karşı Duyarlılık Testi.....	58

4.8. Değişik İnkübasyon Sürelerinde Amilaz ve Proteaz Enzimlerinin Aktivitesi.....	58
4.9. Amilaz ve Proteaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	61
4.10. Amilaz ve Proteaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	63
4.11. Amilaz ve Proteaz Enzimleri Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi.....	65
4.12. Elektroforez İşlemi.....	68
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	70
6.REFERANSLAR.....	77
7.TABLoların LİSTESİ.....	91
8. ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	92
9.RESİM LİSTESİ.....	93
10.ÖZGEÇMİŞ.....	94

TEŞEKKÜR

Tezin hazırlanması sırasında bilgi ve deneyimleri ile desteğini, yanı sıra sabrını da benden hiçbir zaman esirgemeyen, alçak gönüllülüğü ve bilgisiyle örnek bir bilim adamı olarak, danışman hocam ve Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanımız sayın **Prof. Dr. Kemal GÜVEN**'e mükemmel yol göstericiliği, tavsiyeleri, cesaretlendirmeleri için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında desteğini gördüğüm ve biyokimyasal deneylerimde bilgisini, ilgisini, deneyimlerini benimle paylaşan ve spektrofotometrik ölçümlerde kolaylık sağlayan sayın **Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL**'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bilgilerinden ve desteğinden yararlandığım, güler yüzünden her zaman moral bulduğum ve Diyaliz tüpü temin etmemi sağlayan sayın hocam **Yrd. Doç. Dr. Sema AGÜLOĞLU FİNCAN**'a ve **Yrd. Doç. Dr. Veysel TOLAN**'a değerli katkılarından ötürü teşekkür ederim.

Çalışmamda bakterilerin teşhisinde, gram ve spor boyama konusunda yardımcı olan öğretim üyelerinden sayın **Prof. Dr. Kadri GÜL** ve asistanı **Arş. Gör. Şebnem NERGİS**'e, Bakterilerin fotoğraflarını çekmemizde yardımcı olan D.Ü Tıp Fak. Histoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Yusuf NERGİS**'e, ayrıca D.Ü Tıp Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca elektroforetik çalışmalarımda yardımını gördüğüm D.Ü Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın **Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ**'e teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım ve tez yazım aşamamda desteğini gördüğüm **Arş. Gör. Murat YAVUZ**'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım her türlü yardımı ve desteği gösteren, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan D.Ü Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencilerinden **Sadin ÖZDEMİR**'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca katkılarından dolayı arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Her koşulda bana her türlü desteği veren, sabır, özveri, anlayış ve güven gösteren mükemmel aileme, en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Bu zor çalışmanın her aşamasında desteğini esirgemeyen, meşguliyetlerime katılan ve katlanan ve her zaman yanımda olup moral veren **Arş. Gör. Ecevit BEKLER**'e teşekkür ederim.

AMAÇ

Sıcak su kaplıcalarından izole edilen termofil bakterilerin endüstriyel amaçlı kullanılan enzimlerin kaynağı olmaları ve oldukça önem arz etmelerinden dolayı bu çalışmada Ağrı ili, Diyadin ilçesi sıcak su kaynaklarından su ve toprak örneklerinden termofil bakteri izolasyonu gerçekleştirilerek bu bakterilerin endüstriyel açıdan önemli bazı enzimleri üretme yetenekleri araştırılıp bu enzimlerin karakteristik bazı özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılması amaçlanmaktadır.

ÖZET

Bu çalışmada, Diyadin (Ağrı) sıcak su kaynaklarından su ve toprak örnekleri alınarak bu örneklerden 4 bakteri izole edildi. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal analizleri yapıldı. İzole edilen bakterilerden 1 nolu bakterinin çubuk şeklinde, gram pozitif, spor oluşturan, hareketli, ılımlı termofil olduğu ve 3 nolu bakterinin ise çubuk şeklinde, gram pozitif, spor oluşturan, hareketsiz ve ılımlı termofil olduğu belirlendi. Bakterilerin üremesi için optimum pH 1 ve 3 nolu izolatlar için sırasıyla 8 ve 7, optimum üreme sıcaklığı ise sırasıyla 50 °C ve 55 °C olarak belirlendi.

Elde edilen izolatların ekstraselüler α -amilaz ve proteaz enzimi üretme yetenekleri araştırılarak, enzim aktivasyonunun optimum koşulları belirlendi. 1 nolu izolatın optimum α -amilaz üretimini 40. saatte (21,96 U/mg) gerçekleştirdiği ve α -amilaz aktivitesinin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 8 ve 60 °C olduğu, proteaz üretiminin optimum 24. saatte (771 U/mg) gerçekleştiği ve proteaz aktivitesinin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 9 ve 50 °C olduğu belirlendi.

3 nolu izolat için ise α -amilaz üretiminin optimum 24. saatte (32 U/mg) gerçekleştiği ve amilaz aktivitesinin optimum pH ve sıcaklık koşullarının 7 ve 70 °C olduğu, protez üretiminin optimum 36. saatte (421 U/mg) gerçekleştiği ve proteaz aktivitesinin optimum pH ve sıcaklığının sırasıyla 10 ve 50 °C olduğu tespit edildi.

Bu izolatlardan elde edilen α -amilaz ve proteaz enzimleri amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerine tabi tutuldu ve bu enzimlerin aktivitesi üzerine ağır metallerin etkisi araştırıldı. 1 (KP1)'in ekstraselüler α -amilaz aktivitesinin 1,5 mM Mn^{+2} ve 1,5 mM Cu^{+2} iyonlarının bulunduğu ortamda arttığı, %1'lik SDS bulunan ortamda aktivitenin azaldığı, 1,5 mM Hg^{+2} iyonu bulunan ortamda ise enzimin tamamen inhibe olduğu belirlendi. İzolat 3 (DV3)'ün α -amilaz aktivitesinin 1,5 mM Hg^{+2} iyonu bulunan ortamda tamamen inhibe olduğu tespit edildi.

İzolat 1 (KP1) için proteaz aktivitesinin 1,5 mM Ca⁺² ve 1,5 mM Cu⁺² iyonlarının bulunduğu ortamda arttığı, 1,5 mM Hg⁺² iyonu 1,5 mM EDTA, %1'lik SDS bulunan ortamda aktivitenin azaldığı ve 1,5 mM PMSF bulunan ortamda ise enzimin tamamen inhibe olduğu belirlendi.

İzolat 3 (DV3) için 1,5 mM Ca⁺² ve 1,5 mM Zn⁺² iyonlarının bulunduğu ortamda proteaz aktivitesinin arttığı, 1,5 mM Hg⁺², %1'lik SDS bulunan ortamda ise aktivitenin azaldığı, 1,5 mM EDTA, 1,5 mM PMSF bulunan ortamda ise enzimin tamamen inhibe olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Sıcak su kaynakları, Bakteri izolasyonu, Termofil bakteri, Basil, α -Amilaz, Proteaz, Ağır metal

ABSTRACT

In this study, water and soil samples from Diyadin (Agri) hot water springs were collected and four bacteria were isolated. Morphological, physiological, and biochemical analyses of these isolates were conducted. From the bacteria that were isolated, it was found that bacterium number 1 was rod-like, gram positive, spore-producing, active and mild thermophile and that bacterium number 3 was rod-like, gram positive, spore-producing, inactive and mild thermophile. The optimum pH for isolates number 1 and 2 for the bacteria to produce was determined to be 8 and 7, respectively, and their incubation temperature as 50 °C and 55 °C.

Extracellular α -amylase and protease enzyme production capabilities of the obtained isolates were studied and the optimum conditions of the enzyme activation were determined. It was found that isolate number 1 conducted its optimum α -amylase production at the 40th hour (21,96 U/mg) and optimum pH and temperature values of α -amylase activity were 8 and 60 °C, respectively, optimum protease production was conducted at the 24th hour (771 U/mg) and optimum pH and temperature values of protease activity were 9 and 50 °C, respectively.

It was determined that α -amylase production for isolate number 3 was conducted at the 24th hour (32 U/mg) and optimum pH and temperature conditions of α -amylase activity were 7 and 70 °C, optimum protease production was carried out at the 36th hour (421 U/mg) and optimum protease activity and temperature were 10 and 50 °C, respectively.

α -amylase and protease enzymes obtained from these isolates were exposed to ammonium sulphate precipitation and dialysis processes and the affects of the heavy metals on the activity of these enzymes were studied. It was found that in the media of 1,5 mM Mn^{+2} and 1,5 mM Cu^{+2} α -amylase activity for isolate 1 (KP1) increased, in the media of %1 SDS the activity decreased, and in the media of 1,5 mM Hg^{+2} ion the enzyme was completely inhibited. It was determined that the activity for isolate 3 (DV3), in the media of 1,5 mM Hg^{+2} was completely inhibited.

It was found that the protease activity for isolate 1 (KP1) increased in the media of 1,5 mM Ca^{+2} and 1,5 mM Cu^{+2} , the activity decreased in the media of 1,5 mM Hg^{+2} ion, 1,5 mM EDTA, %1 SDS, and enzyme was completely inhibited in the media of 1,5 mM PMSF.

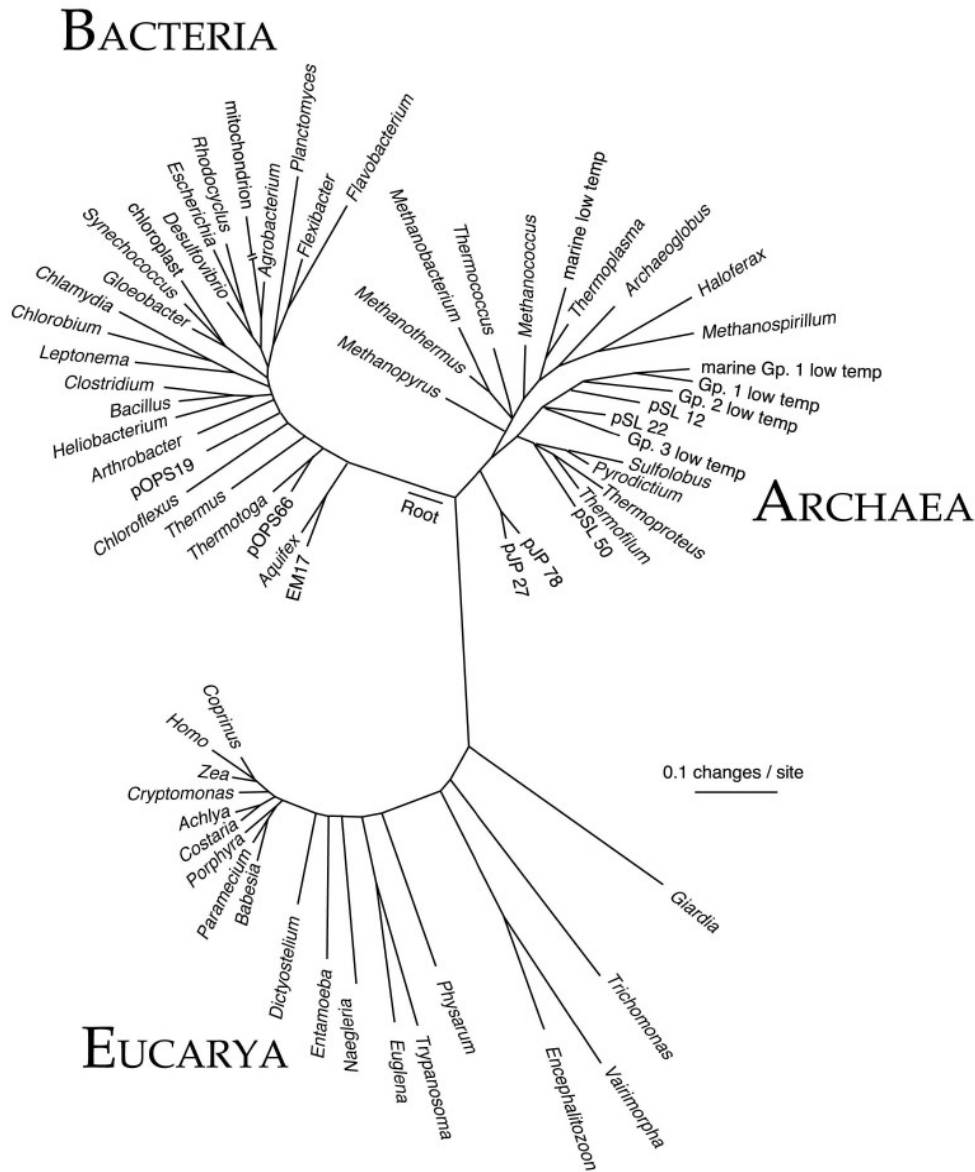
It has been determined that the activity increased in the media of 1,5 mM Ca^{+2} and 1,5 mM Zn^{+2} for isolate 3 (DV3), the activity decreased in the media of 1,5 mM Hg^{+2} , %1' SDS, and enzyme was completely inhibited in the media of 1,5 mM EDTA, 1,5 mM PMSF.

Key Words: Hot water springs, Bacteria isolation, Thermophile bacterium, Bacil, α -amylase, Protease, Heavy metal

1.GİRİŞ

1.1. CANLILARIN SİSTEMATIĞI:

Sistematik sınıflandırma ve organizmaların adlandırılmasına “taksonomi” denir (Mc Kane ve Kandel, 1996). Taksonominin amacı; organizmaların karşılaştırılması ve identifikasyonunu sağlamak, aynı zamanda bilinmeyen türlerin teşhis edilmesi için kolaylık sağlamaktır (Carpenter, 1972; Benjamin ve Parsons, 1991; Black, 1996).



Şekil 1: Canlıların filogenetik sınıflandırılması

(www.epsc.wustl.edu/.../Homepages/Carrine%20Blank.htm)

1.2. BAKTERİLERİN SINIFLANDIRILMASI:

Mikroorganizmaları belli, geçerli ve devamlı bir klasifikasyona tabi tutma fikri eskiden başlamış olmasına karşın, yeni mikroorganizmaların bulunması ve bunların değişik karakterlere sahip olmaları nedeniyle yapılan sistematikler devamlı değişmekte ve yerlerine yeni bulgulara uygun olanları hazırlanmakta ve konulmaktadır (**Arda, 2000**).

Mikroorganizmaların özellikleri, onları yüksek canlılarda uygulandığı gibi filogenetik temele dayalı olarak tam bir şekilde tür, cins, familya, takım, sınıf, şube taksonomik dizisine uygun bir sınıflandırma yapabilmek için sınırlıdır. Yüksek canlılarda bu tür sınıflandırmalar için fosillerden ve bunların gösterdiği evrimsel değişiklikten yararlanılır. Mikroorganizmaların sınırlı sayıda fosili bulunabilmekte ise de bunların özelliklerinin yüksek canlıların fosillerine bakılarak incelenmesi olanaksızdır (**Bilgehan, 2002; Mc Kane ve Kandel, 1996; Black, 1996; Benjamin ve Parsons, 1991**). Ayrıca mikroorganizmaların gözle görülmemeleri ve küçük olmaları bunların birçok özelliğinin saptanamamasına da yol açmaktadır (**Arda, 2000**).

Mikrobiyolojik teknikler ilerledikçe, mikroorganizmaların karakterlerinin büyük bir bölümü açığa kavuşmakta ve sistematikteki yerleri de daha sağlam, belirgin ve değişik olmaktadır.

1.2.1. Bakteriyel sınıflandırmanın tarihçesi:

- Mikropları ilk bulan, şekillerini çizen ve hareketlerini izleyen A. Van Leeuwenhoek ve daha sonra Carl Von Linne (Carolus Linneaus) bakterileri kendi yaptığı bir sınıflamaya dahil etmiş ve ilk defa klasifikasyonuna çalışmıştır (**Trüper, 2005, Carpenter, 1972**).
- Otto Frederich Müller, 1773' de bakterileri iki cins olarak vermiştir. Monas: oval ve yuvarlak bakteri türleri ve Vibrio: uzun formulu (çomak biçiminde) olanları kapsamaktadır (**Trüper, 2005; Arda, 2000**).
- Ehrenberg, mikroorganizmaları 4 cinse ayırmıştır (*Bacterium, Spirillum, Spirochaeta, Spirodiscus*) (**Trüper, 2005; Carpenter, 1972**).

- Mikroorganizmaların morfolojik olarak sınıflandırılması F. Cohn tarafından 1872'de yapılmıştır (**Ramagoma, 2006; Trüper, 2005; Fritze, 2004; Cohn, 1875**).
- Migula, 1897'de mikropları sadece morfolojilerine göre değil, aynı zamanda renk (koloni) ve bazı fizyolojik karakterlerini dikkate alarak sınıflandıran (nitrogen fiksasyonu gibi) bir sistem geliştirmiştir (**Trüper, 2005; Maugeri ve ark., 2001**).
- Bakterileri modern anlamda ilk defa sistematize etmek, Buchanan (1917) ile başlamıştır. Buchanan yüzden fazla mikrobiyoloğun teşviki ve yardımı ile, ilk defa, 1923'de Society of American Bacteriologists tarafından "Manual of Determinative Bacteriology" yayımlanmıştır. Bu kitabı hazırlayan komitenin başına da D.H. Bergey getirilmiştir. Bu manual zamanla geliştirilerek 1974'de 8. baskısını yapmıştır. 1984-1986 yıllarında "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" adı altında ve 4 ciltlik bir yayın çıkarılmıştır (**Trüper, 2005; Yılmaz, 2002; Arda, 2000**).

Yukarıda gösterildiği gibi bakteriler, birçok kriter esas alınarak sınıflandırmalara tabi tutulmuşlardır. Bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajların yanı sıra zamana göre de değişiklikler gösterdiği bilinmektedir. Bakterilerinin taksonomisinde tarihsel süreçte yapılan girişimler, ele alınan başlıca kriterler ve bunlara göre yapılan sınıflandırmaların en önemlileri şunlardır:

1.2.2. Doğal (filojenik) klasifikasyon: Olası orjinleri ile ilgili olarak mikroorganizmalar arasındaki ilişkileri göstermek ve ortak orjinli organizmaları benzer şekilde gruplandırmayı amaçlamaktadır (**Carpenter, 1972**). Burada benzerlik kavramı içinde morfolojik, kültürel, fizyolojik, biyokimyasal, kimyasal, serolojik, patolojik, vs. özellikler de bulunmaktadır (**Brooks ve ark., 1991; Kingsbury, 2000; Mc Kane ve Kandel, 1996**).

Morfolojik özellikleri: Bakteri kolonilerinin mikroskop altındaki bireysel formları (yuvarlak, çubuk, kokoid, virgül, spiral), büyüklüğü, kenarları (düz, köşeli, eğri, paralel vs.), dizilişi (küme, zincir, filament), spor durumu ve varsa konumu, boyanma özelliği, pigmentasyonuna, flagella bulundurma bulundurmamasına bakılarak incelenir.

Kültürel özellikleri: Bakterilerin katı ve sıvı ortamlardaki üreyebilme özelliklerine bakılır. Yani aerob, anaerob olup olmamaları, hareket özelliğine sahip olup olmamalarına bakılarak incelenir.

Fizyolojik özellikleri: Bakterilerin üreme ısıları, üreme pH'ları, inkübasyon süreleri, oksijene ihtiyaç durumları araştırılır.

Biyokimyasal özellikleri: Bakterilerin şeker fermantasyonu, nişasta, kazein ve jelatin hidrolizi, katalaz testi, oksidaz testi, indol üretimi, üreaz testi v.s gibi testler araştırılır.

1.2.3. Numerikal klasifikasyon: Bu sistemde mikroorganizmaların benzeyen ve benzemeyen yönleri değerlendirilmeye tabi tutulur. Böylece, taksonomik uzaklık, ortak olan karakterlerin toplam karakterlere oranı üzerinden hesaplanır. Bu yöntem için bir çok fenotipik özelliklere (görülebilir veya saptanabilir) gereksinim vardır (**Gest, 1999; Leifson, 1966; Mercan, 2003; Sneath, 1995; Arda, 2000**).

1.2.4. Genetik klasifikasyon: Bu sistemde bakterilerin nükleik asit analizleri ile klasifikasyon yapılmaktadır. Bu işlem için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan biri, DNA'lardaki baz sıralarının yüzde olarak kompozisyonu (% G+C) ve diğeri, mikroorganizmalar arasında hibridizasyon oranlarıdır ve diğeri bir yöntem de 16 S rRNA genetik dizi analizidir (**Imhoff, 2003; Fritze, 2004; Bilgehan, 2002; Mc Kane ve Kandel, 1996**).

1.2.5. Antijenik klasifikasyon: Bazı bakteri familya veya cinslerini kapsayan ve bu bakteri hücrelerinin antijen maddelere karşı gösterdikleri özelliklere göre klasifikasyon yapılmaktadır (**Carpenter, 1972**).

1.2.6. Fajla tiplendirme: Türler içi veya türler arası ilişkiyi saptamada fajla tiplendirme de kullanılmaktadır. Aynı türe ait suşlar, kendilerine özgü fajlara göre gruplara ayrılabilirler (<http://www.mikrobivoloji.org/genelpdf/210010701.pdf>).

1.3. Gram Pozitif Spor Oluşturan Basiller:

Basil, çomak ya da çubuk şeklindeki bakteri türlerinin genel adıdır. Genellikle 1 ve 10 µm uzunluklar arasındadır, bazıları o kadar küçüktür ki nokta şeklinde görünürler, bu tip basillere “coccobacilli” denir (Ramagoma, 2006; Mc Kane ve Kandel, 1996, Drobniewski, 1993; Brooks ve ark., 1991).

Endospor, bazı bakteri cinslerinin hücrelerinin içinde olumsuz şartlara karşı oluşturdukları yapılardır. Bakteriyel sporlar genellikle çok yüksek sıcaklık, kuruluk ve radyasyona karşı yüksek oranda dirençlilik sağlar (Bahçeci, 2004; Madigan ve ark., 2003; Atlas, 1995). Endosporlar, çevresel şartlara göre oluşturuldukları için dirençlilik dereceleri büyük oranda çevresel şartlara bağlıdır (Yılmaz, 2002). Sadece birkaç bakteri cinsi endospor oluşturur. Bunlar; *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakterilerdir (Beldüz ve ark. 2003; Atlas, 1995). Endospor oluşturan basil bakteriler genellikle Gram pozitif, zorunlu aerob veya fakültatif anaerobtur (Benjamin ve Parsons, 1991).

Aşağıdaki tabloda doğada bulunan ve klasifikasyonu yapılan *Bacillus* cinsi bakterilerin 16S RNA/DNA oranlarına göre bu cins bakterilerin ve yakın cinslerin karşılaştırılması yapılmıştır ve 88’inin *Bacillus* olduğu belirlenmiştir (Fritze, 2004).

Tablo 1: Doğada bulunan ve klasifikasyonu yapılan *Bacillus* cinsi bakteriler

<u>Sistemik durum</u>	<u>Tür/Alt tür sayısı</u>
Domain <i>Bacteria</i>	
Şube BXIII. <i>Firmicutes</i> phy. nov.	
Sınıf III. <i>Bacilli</i>	
Takım I. <i>Bacillales</i> AL	
Familya I. <i>Bacillaceae</i> AL	
Cins I. <i>Bacillus</i> AL	88/2
Cins II. <i>Amphibacillus</i> VP	3
Cins III. <i>Anoxybacillus</i> VP	3
Cins IV. <i>Exiguobacterium</i> VP	
Cins V. <i>Filobacillus</i> VP	1
Cins VI. <i>Geobacillus</i> VP	10

Cins VII. <i>Gracilibacillus</i> VP	2
Cins VIII. <i>Halobacillus</i> VP	5
Cins IX. <i>Jeotgalibacillus</i> VP	1
Cins X. <i>Lentibacillus</i> VP	1
Cins XI. <i>Marinibacillus</i> VP	1
Cins XII. <i>Oceanobacillus</i> VP	1
Cins XIII. <i>Paraliobacillus</i> VP	1
Cins XIV. <i>Saccharococcus</i> VP	
Cins XV. <i>Salibacillus</i> VP	–
Cins XVI. <i>Ureibacillus</i> VP	2
Cins XVII. <i>Virgibacillus</i> VP	7
Cins IV. <i>Exiguobacterium</i> VP	
Familya II. <i>Alicyclobacillaceae</i>	
Cins I. <i>Alicyclobacillus</i> VP	8/2
Cins II. <i>Pasteuria</i> AL	3
Cins III. <i>Sulfobacillus</i> VP	3
Familya III. <i>Caryophanaceae</i> AL	
Cins I. <i>Caryophanon</i> AL	
Familya IV. <i>Listeriaceae</i>	
Cins I. <i>Listeria</i> AL	
Cins II. <i>Brochothrix</i> AL	
Familya V. <i>Paenibacillaceae</i>	
Cins I. <i>Paenibacillus</i> VP	45/2
Cins II. <i>Ammoniphilus</i> VP	2
Cins III. <i>Aneurinibacillus</i> VP	3
Cins IV. <i>Brevibacillus</i> VP	11
Cins V. <i>Oxalophagus</i> VP	
Cins VI. <i>Thermicanus</i> VP	
Cins VII. <i>Thermobacillus</i> VP	1
Familya VI. <i>Planococcaceae</i> AL	
Cins I. <i>Planococcus</i> AL	
Cins II. <i>Filibacter</i> VP	
Cins III. <i>Kurthia</i> AL	
Cins IV. <i>Planomicrobium</i> VP	
Cins V. <i>Sporosarcina</i> AL	3

Familya VII. *Sporolactobacillaceae*

Cins I. *Sporolactobacillus* AL

5/2

Cins II. *Marinococcus* VP

Familya VIII. *Staphylococcaceae*

Cins I. *Staphylococcus* AL

Cins II. *Gemella* AL

Cins III. *Jeotgalicoccus* VP

Cins IV. *Macrococcus* VP

Cins V. *Salinicoccus* VP

Familya IX. *Thermoactinomycetaceae*

Cins I. *Thermoactinomyces* AL

6

Familya X. *Turicibacteraceae*

Cins I. *Turicibacter* AL

1.3.1. *Bacillus* Cinsi Bakteriler:

Bacillaceae familyasında aerob veya fakültatif anaerob koşullarda bölünebilir özelliğe sahip, endospor oluşturan çomak şekilli bakterilerdir (Özşahin, 2006; Ramagoma, 2006; Janstova ve ark., 2004; Park, 2003).

Morfolojik özellikleri; mikroskop altında incelendiğinde tek tek veya zincir halinde görülebilirler. Hücreler çubuk şeklinde, oldukça küçük (0,5 x 1,2 µm) ya da büyük (2,5 x 10 µm) olabilirler (Agüloğlu, 1996).

Gram pozitif ya da değişken gramdır. Koloniler genellikle şeffaf ya da donuk renklidir. Bazen krem renkli koloniler meydana gelmektedir. Hareketli veya hareketiz olabilirler. *Bacillus* flagellası genellikle çevre kirpiklere (peritrişya) sahiptir (Yılmaz, 2002).

Olumsuz ortam şartlarına karşı spor oluşturan türleri bulunmaktadır. Sporun hücre içindeki yeri farklı olabilir. Spor hücre merkezinde veya uçta olabilir. Vejetatif hücreden daha dar olabildiği gibi, daha geniş de olabilir. Spor oluşturan bakterilerde sporun konumu bakteri cinslerine göre değişmektedir. Örneğin; *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* sentral endospor oluştururken, *Bacillus stearothermophilus* terminal spor oluşturur (Driks, 2006; Black, 1996). Ayrıca, *B. megaterium*, *B. mycoides* ve *B. subtilis* gibi türlerin vejetatif spor meydana getirdiği ve herhangi bir büyüme ve şişme meydana getirmediği, *B. polymyxa*'nın oluşturduğu sporun oval ve genişliğinin hücre çapından

büyük olduğu, *B. pasteurii*'de oluşan sporun küresel ve vejetatif hücre çapından daha büyük olduğu gözlenmektedir.

Fizyolojik özellikleri; *Bacillus* cinslerinin bazılarının termofilik, bazılarının ise mezofilik oldukları bilinmektedir. Örneğin; *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* ılımlı sıcaklıklarda büyüme gösterirken, *Bacillus stearothermophilus* 65 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda büyüme gösterir (**Demirijian, 2001; Black, 1996**).

Bacillus cinsine ait çoğu bakteri B vitaminini sentezleyemez. Üremek ve gelişmek için gerekli olan bu vitaminleri ortamdan alırlar. Bu nedenle bu tür bakterileri sadece tek bir organik madde içeren ortamda üretmek mümkün değildir. Genellikle maya ekstraktı, pepton gibi maddeleri ihtiva eden kompleks besi ortamlarında üreyebilirler.

Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (**Madigan ve ark., 2003**). *Bacillus*'ların çoğu aerobtur, anaerob olanlar şeker fermantasyonu ve dinitrifikasyon sonucunda oluşan enerjiden faydalanarak ürerler. *B. marcerans* şekeri fermente ederken, *B.licheniformis* denitrifikasyonda rol alır.

Çoğunlukla katalaz aktivitesi pozitifdir (**Yılmaz, 2002**). *Bacillus*'ların bazı türleri güçlü proteolitik özellik gösterir, buna karşın bazı türleri ya zayıf proteolitik özellik gösterir veya hiç göstermez. *B. cellulosae dissolvens* selülozu, *B. amyloliquefaciens* ve *B. amylovorus* nişastayı sindirme özelliğine sahiptir. Termofilik *Bacillus*'lardan termostabil enzimlerinden *Bacillus licheniformis* proteaz ve penisilaz üretiminde, *Bacillus subtilis*, *Bacillus diastaticus*, *Bacillus amyloliquefacien* ve *Bacillus coagulans* amilaz üretiminde kullanılmaktadır (**Hashim, 2005; Burg, 2003; Atlas, 1995; Sarıkaya, 2000; Coral ve Çolak, 2000; Sieraka, 1998; Agüloğlu, 1996**).

Bacillus subtilis'den subtilin antibiyotiği ve *Bacillus pycyaneus*'tan antibiyotik etkisi olan pyocanin elde edilir. Doğada çok az patojen olan *Bacillus* vardır. *Bacillus anthracis* en önemli patojen türüdür ve şarbona neden olmaktadır. *Bacillus alvoi* arılarda, *Bacillus cereus* böceklerde patojen özellik göstermektedir.

Ekolojik özellikleri; Hemen hemen bütün doğal habitatlardan ve diğer pek çok kaynaktan izole edilebilirler. Yaygın olarak toprakta saprofit olarak ve bitki döküntülerinin olduğu yerlerde bulunurlar, fakat kutup bölgeleri, sıcak su kaynakları, kaplıcalar, tatlı su, deniz suyu, çöl toprakları da bu cinslerin yaşam alanlarındandır (**Özşahin, 2006; Maugeri ve ark., 2001; Yılmaz, 2002**).

Tablo 2: Çubuk şeklindeki bakterilerin özellikleri (Derekova, 2007; DeFlauna, 2007; Kevbrin, 2005; D’Souza ve ark., 2004; Yılmaz, 2002; Hawumba ve ark., 2002; Caccamo, 2000; Pikuta ve ark., 2000)

	<i>Bacillus</i>	<i>Anoxybacillus</i>	<i>Geobacillus</i>
Gram özelliği	+	+	+
Sporlar	Elipsoid, sentral, parasentral veya terminal, subterminal	Oval, terminal, subterminal	Oval, silindirik, terminal, paraterminal
Hareket	+	+	+
Anerobik büyüme	Aerobik veya fakültatif aerob	Fakültatif aerob, zorunlu aerob	Fakültatif zorunlu aerob
Maksimum büyüme sıcaklığı	45°C-75 °C	60 °C -72 °C	55 °C -75 °C
Minimum büyüme sıcaklığı	5 °C -20 °C	30 °C -42 °C	37 °C
Maksimum büyüme pH’sı	11	11 (7,5-8,5 optimum)	6,8-7,5
Minimum büyüme pH’sı	4,8	5,7	6,2
Katalaz aktivitesi	+	v (değişken)	+
Kazein hidrolizi	+	+	+
Nişasta hidrolizi	+	+	+
Jelatin hidrolizi	v (değişken)	+	-
Hemoliz	v (değişken)	-	-

1.4. BİYOTEKNOLOJİ:

Biyoteknoloji, canlıların ve canlı sistemlerin bilim ve mühendislik teknikleri uygulanarak mal ve hizmet üretmek amacıyla kullanılmasıdır. Biyoteknoloji, en genel şekliyle sorunların çözülmesi ve yararlı ürünlerin üretilmesi amacıyla biyolojik süreçlerin kullanılması olarak da tanımlanabilir. Biyoteknoloji, temel bilim buluşlarını kısa sürede yararlı ticari ürünlere dönüştürebilmesiyle bir anlamda kendi talebini de yaratabilir. Bu yönüyle de öteki teknolojilerden ayrılır.

“Biyoteknoloji” alanındaki araştırma ve eğitim çalışmaları ulusal ve uluslararası örgütlerce desteklenmekte; bazı ülkelerde bu alanda yapılan büyük yatırımlarla bu ülkeler dünya liderliğine soyunmaktadır. Son yirmi yılda, dünyadaki uygulama ve araştırma konularına göz atıldığında, biyoteknolojinin özellikle sağlık, tarım, gıda sektörleri ile kimyasalların çevreye verdiği zararın giderilmesi için de kullanıldığı görülmektedir (**Kıymaz ve Tarakçıoğlu, 2003; Telefoncu, 1996**).

1.4.1. Mikroorganizmaların Biyoteknolojide Kullanımı:

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte, ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedirler (**Kıran ve ark., 2006; Kıran, 2003**).

Çok çabuk çoğalmaları, tarım atıkları gibi ucuz kaynaklarla beslenebilmeleri, çok değişik ürünlerin üretilmesi, genetik modifikasyonların kolay yapılabilmesi bunun sebeplerindedir.

Dünyada bol miktarda bulunan çok çeşitli endüstri atıkları, bu mikroorganizmalar tarafından substrat olarak kullanılabilir. Böylece birçok atık maddenin değerlendirilmesi veya yok edilmesine de yardımcı olabilir. Kontrol edilebilen şartlarda fermantasyon reaktörü içinde sürekli kültür halinde üretilbildiğinden, üretimleri çevre ve iklim şartlarından etkilenmez (**Özdemir, 2004; Castro, 1999**).

Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görülmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Endüstriyel üretimde mikrobiyal kaynaklı enzimlerin ekonomik oluşları, mevsimsel ve potansiyel kısıtlamalara bağlı kalmayışları açısından avantajları uzun zamandır savunulmaktadır (**Topal, 2000**).

1.4.2. Termofil Mikroorganizmaların Biyoteknolojide Kullanımı :

Termofiller; sığ, sıcak yer kaynakları, hidrotermal ağız sistemleri, volkanik adalardaki tortullar ve derin deniz hidrotermal ağızları dahil olmak üzere jeotermal olarak ısınmış bir çok deniz ve kara habitatlarından izole edilmiş, 60 ve 108 °C arasında optimal büyüme ısılarına sahip mikroorganizmalardır (**Maugeri ve ark., 2001; Atlas, 1995**).

Biyoteknolojinin ilerlemesiyle ve enzimlerin saflaştırılmasıyla enzim uygulamalarının sayısı kat kat artmıştır ve termostabil enzimlerin elde edilebilirliğiyle endüstriyel işlemler için bir çok yeni imkan ortaya çıkmıştır. Esas olarak termofilik organizmalardan izole edilen termostabil enzimler, genel iç stabilitelerinden dolayı birçok ticari uygulama alanı bulmuştur (**Haki, 2003**).

Son zamanlarda termofolik enzimler, esas olarak yüksek ısılarda stabilite ve denatürant toleranslarından dolayı endüstriyel işlemlerin geniş bir alanında potansiyel olarak uygulanabilir durumdadır. Böyle enzimler kimyasal, gıda, ilaç, kağıt, tekstil ve diğer endüstrilerde kullanılmaktadır (**Turner, 2007; Corderio, 2002**).

Termofillerin yüksek sıcaklıkta üretimi, kontaminasyon riskini azalttığı, yapışkanlığı azaltarak karışım yapmayı kolaylaştırdığı ve yüksek derecede substrat çözünebilirliğine yol açtığı için teknik ve ekonomik açıdan ilgi çekicidir. Bununla birlikte, mezofilik örnekleriyle kıyaslandığında bu organizmalar tarafından gerçekleştirilen biyokütle genellikle düşüktür. Termofillerin ve hipertermofillerin fermantasyon işlemlerini ilerletmek için özel aletler ve spesifik işlemler gerçekleştirilmiştir (**Turner, 2007**).

Pek çok araştırmacı, termofiliden sorumlu fizikokimyasal farklılıkları belirlemek için termofilik ve mezofilik organizmalardan elde ettikleri enzimleri karşılaştırmıştır (**Buonocore, 1976**).

1.4.3. ENZİMLER:

Enzimler metabolizma reaksiyonlarının pek çoğunu hızlandıran protein yapısında biyolojik katalizörlerdir ve dünyamızdaki yaşamı mümkün kılan etmenlerin başında gelmektedir (**Kazan, 2005; Temizkan ve Arda, 2004**). Bir hücre içinde yapıldıktan sonra görev yapacağı hücre dışı ortama salınan enzimlere **Ekstraselüler**, sentezlendikleri hücre içinde kalarak etkisini gösteren enzimlere **İntraselüler** enzimler denir (**Özata ve Türe, 2001**).

1.4.3.1. Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Enzimle katalize edilen reaksiyonların hızı üzerine, enzim ve substrat konsantrasyonlarının, sıcaklığın, ortamın pH'sının, zamanın, reaksiyon ürünlerinin, hormonların ve ışık vs. gibi fiziksel etkenlerin rolü vardır:

- Enzim Konsantrasyonunun Etkisi: Enzim reaksiyonunun hızı, genel olarak enzimin konsantrasyonu ile orantılıdır. Enzim miktarı arttıkça reaksiyon hızı paralel olarak artar.
- Substrat Konsantrasyonunun Etkisi: Sabit enzim konsantrasyonunda, enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artar, bundan sonra substrat konsantrasyonunun artması ile reaksiyon hızı değişmez.
- Enzimatik Aktiviteye Isının Etkisi: Enzim reaksiyonlarının hızı ısı ile artar, fakat belirli bir ısıya ulaşıldıktan sonra enzimler denatüre olduklarından etkilerini kaybederler.
- pH'nın Enzim Aktivasyonunda Rolü: Enzimler genellikle belirli bir pH derecesinde en yüksek aktiviteye sahiptirler. Bu pH'ya enzimin "Optimum pH'sı" denir.
- Zamanın Rolü: Enzim aktivasyonunda reaksiyon süresi ve oluşan ürünlerin de rolü vardır.
- Tuz Konsantrasyonu: Ortamda fazla madensel tuzların bulunması enzim aktivitesine olumsuz yönde etkiler.
- Diğer Faktörler: Ultraviyole ışınları, proteinleri etkileyen diğer fiziksel ve kimyasal faktörler aynı tarzda enzim aktivitesine de olumsuz yönde tesir ederler (**Gözükara, 2001**).

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonların hızını arttıran katalizörler olarak tanımlanır ve reaksiyon sonunda değişmeden çıkarlar. İnsanların enzimlerden yararlanmasının çok eski çağlara kadar dayandığı bir gerçektir. Bazı mikroorganizmaların ürettiği enzimlerle gerçekleşen mayalı ekmek, peynir, yoğurt ve şarap yapımı binlerce yıldan beri bilinmektedir (**Haki, 2003; Mc Kane ve Kandel, 1996; <http://www.amano-enzyme.co.jp/english/enzyme/industry.html>**).

Enzim teknolojisi; ekonomik, etkili ve biyoteknolojik tekniklere olan büyük ihtiyaç nedeniyle ilerleme kaydetmiştir. Biyoteknoloji sayesinde, yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur. Buna göre bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilirliği; maliyet bakımından ucuz olmasını, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olmasını ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasını gerektirmektedir (Wiseman, 1987).

Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler, çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük, ekonomik ve endüstriyel alanlarda yerlerini almışlardır. Bugün enzimler ekmek, bira, peynir gibi gıdaların yapımında, çeşitli deterjan ve temizlik maddelerinin üretiminde, kağıt ve kumaş endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanıldığı gibi tıpta teşhis ve tedavide de önemli rol oynamaktadır (**Bajpai, 1987; Daniels, 1992; Lee, 1994; Kim, 2005**).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedirler. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasıdır (**Kıran, 2006, Kıran, 2003; Nascimento ve Martins, 2004**).

Tablo 3: Endüstriyel önemi olan enzimler ve bu enzimlerin kullanım alanları
(Dağaşan, 1997; Telefoncu, 1996)

ENZİM	UYGULAMA ALANI
Alfa Amilaz	Nişasta hidrolizi Ekmekçilik Silaj üretimi Çamaşır ve bulaşık makinesi deterjanları Haşıl sökme Alkol Fermantasyonu Peynir ve bira gibi gıda sektörü
Beta Amilaz	Maltoz şurup
Glukoamilaz	Glukoz şurup
Xylanaz	Nişasta gluten ayrımı Ekmek Hacmi
Pektinesteraz Arabinaz	Meyve suyu berraklaştırma
Proteaz	Süt çöktürme Ekmek yapımı Kek yapımı Et yumuşatma Silaj üretimi Kumaş ağartma İpek kalitesinin yükseltilmesi Deterjan Dericilik
Selülaz	Tekstilde pamukçuk giderme ve taş yıkama Deterjan
Lipaz	Yağ esaslı kirlerin ve lekelerin giderilmesi Yağların parçalanması ve interesterifikasyon

1.5. AMİLAZLAR:

Amilazlar (E.C.3.2.1.1), nişastanın α -1,4 glikozidik bağlarını koparan farklı bakteri ve mantarlar tarafından oluşturulan ekstraselüler enzimlerdir. Bazıları serbest şeker üretmeden nişastayı hidrolizlerken bazıları da serbest şekerler meydana getirirler (Kembhavi, 2005; Najafi ve Sariri, 2006; Hamilton, 1999; Sarıkaya, 2000; Coral ve Çolak, 2000; Bolton ve ark., 1997; Mc Kane ve Kandel, 1996; Brena ve ark., 1996; Brosnan, 1992). Bazı bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen α -amilaz, β -amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler (Kıran ve ark., 2006; Lee, 1994).

1.5.1. Nişastayı Hidrolizleyen Başlıca Enzimler

a. Alfa Amilaz (Endoamilaz): Çok yavaş olarak hidroliz olayına katılırlar. Hasta olarak adlandırılan bir seri üç veya daha fazla α -1,4 bağlı glukoz birimlerini taşıyan ürünler açığa çıkarırlar. Buna, özellikle klorür ve bazı iyonlar da aktivatör olarak etki eder.

α -amilaz, glikojenin dokularda yıkılmasında rol oynamaz, zira glikojen 1,4 glikozid bağının yıkılışı dokularda fosforilize olur. Glikojendeki 1,6 bağlarını da yine amilaz değil, ancak amilo 1,6 glikozidaz yıkar.

b. Beta Amilaz (Egzoamilaz): Bunlar nişastanın amiloz kısmını maltoza kadar hızlı bir şekilde hidroliz ederler. Polisakkaritte α -1,4 glikozid bağlarını hidroliz ederek zincirlerin redükte olmayan uçlarında maltoz birimlerini ayırırlar. Bitkisel bir enzimdir ve özellikle bira, malt ekstrelerinde bulunur (Korkmaz, 2006; Özata ve Türe, 2001).

c. Gama Amilazlar: Kısa bir süre önce bağırsak ve karaciğerde ortaya çıkan, nişastayı maltoz birimlerine değil glukoz birimlerine kadar parçalamaktadır. Enzim 1,4 ve 1,6 bağlarını hidrolizleyip nişasta ve glikojeni tamamen parçalayabilir (<http://www.online-medical-dictionary.org/?q=gamma-Amylase>).

1.5.2. Termostabil Amilazlar

Termostabil enzimler, yüksek sıcaklıklarda bile aktivitelerini yitirmeyen enzimlerdir. Endüstriyel işlemler, 110°C kadar yüksek sıcaklıklarda α -amilazın kullanımını gerektirir (Brosnan, 1992). Son zamanlarda yapılan araştırmalar termostabil amilazlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu enzimler genellikle, nişastanın jelatinasyonu ve sıvılaştırılması, kağıt, tekstil ve deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu yüzden de bu enzimleri

üreten yeni kaynaklara gereksinim duyulmaktadır (**Kıran ve ark., 2006; Özşahin, 2006; Hashim, 2005; Haki ve ark., 2003; Özdemir, 2004; Burg, 2003; Corderio ve ark., 2002; Demirjian, 2001; Sarıkaya ve ark., 2000; Topal ve ark., 2000; Bolton ve ark., 1997**).

Ekstraselüler enzimlerin bir çoğu *Bacillus* cinsi bakterilerden elde edilmektedir ve endüstriyel alanda önemlidir (**Corderio ve ark., 2002**). Termofilik bir bakteri olan *Bacillus staerothermophilus* ticari önemi olan termostabil amilaz üretmektedir. *Bacillus subtilis*, *Bacillus caldolyticus*, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen amilazlar termostabildir (**Haki ve Rakshit, 2003**).

1.5.3. Amilazın Biyoteknolojide Kullanım Alanları:

Amilazlar, tekstilde kumaş ve kağıttaki gözeneklerin doldurulmasında, dokunmuş kumaşta nişastanın kaldırılmasında, kuru temizlemede yemek ve nişasta içerikli lekelerin giderilmesinde, gıda biyoteknolojisinde; hamurların sıvılaştırılmasında, mısır ve çikolata şurubu üretiminde, ekmek üretiminde, düşük kalorili bira üretiminde, malt yapımında kullanılmaktadır (**Özşahin, 2006; Mc Kane ve Kandel, 1996, Atlas, 1995; Brena ve ark., 1996; Brosnan, 1992; Apar ve Özbek, 2004; Haq, 2003**). Gıda endüstrisinde amilazların kullanımı yaygındır ve özellikler ekmekçilikte kullanılır. Bunlar;

- Undaki nişastanın hamurda şeker haline gelmesini sağlar
- Fermantasyonu hızlandırır
- Oluşan gaz miktarını artırır
- Ekmek yapılma süresini kısaltır
- Ekmek hacmini artırır
- Ekmek rengini, yumuşak ve taze kalma süresi, ekmeğin tat ve kalitesini düzeltici etkilerde bulunur.

Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler, nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedir. Bu işleme haşılama adı verilir. Kumaş dokunduktan sonra kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Haşıl alma ajanı olarak da yaygın olarak α -amilaz enzimi kullanılmaktadır (**Özçelik, 2006; Özdemir, 2004**).

Nişastayı hidrolizleyen amilazların pek çok ticari uygulaması vardır. Nişasta polimeri, diğer polimerler gibi, tam hidrolizi için enzimlerin bir kombinasyonunu gerektirir.

Bunlar, α -amilazları, glikoamilazları, β -amilazları, izoamilazları ve pullanazları kapsar. Nişasta hidrolitik enzimleri, dünya enzim tüketiminin %30'unu oluşturur **(Haki, 2003)**.

α -amilazlar için başlıca piyasa glukoz ve fruktoz gibi nişasta hidrolizatlarının üretiminde yatar. Nişasta, yüksek fruktoz mısır şuruplarına (HFCS) dönüştürülür. Yüksek tatlandırıcı özelliklerinden dolayı bunlar içecek endüstrisinde alkolsüz içecekler için tatlandırıcı olarak büyük miktarlarda kullanılır **(Gupta, 2003)**.

Nişasta işleminin ilk adımı, jelatinleştirme olarak bilinen 100°C'ye kadar ham nişastanın ısıtıldığı enerji gerektiren bir işlemdir. Jelatinleştirilmiş nişasta son derece yapışkandır ve böylece karıştırma ve pompalamayla ilgili ciddi sorunlar teşkil eder. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için termostabil α -amilazlarının eylemiyle oluşan sıvılaştırma ile jelatinleştirme çiftleştirilir **(Mamo ve Gessesse, 1999)**.

Meyve suyu endüstrisinde de kullanım alanı bulan enzim, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyvede halen nişasta bulunduğu için meyve suyunda bulanıklık meydana gelmektedir **(Özçelik, 2006)**.

Amilazlar ayrıca tıbbi alanda da ilaç sanayinde kullanılmaktadır **(Kandra, 2003)**.

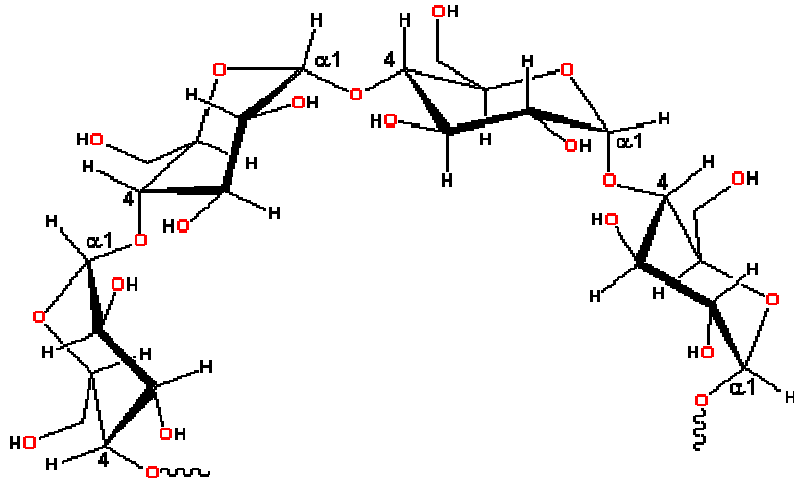
Deterjanlarda enzim uygulamasının esas avantajı, enzimsiz deterjanlara göre çok daha yumuşak olmasından dolaydır. İlk dönem otomatik bulaşık makinesi deterjanları çok sert idi, yutulduğunda zarara sebep oluyordu ve hassas in porseleni ve tahta bulaşık takımları için uygun değildi ve amilazları içeren deterjanlar ile nişasta artıkları daha kolay giderilmektedir.

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde yapışkanlığın giderilmesi için amilazlar kullanılır **(Gupta ve ark., 2003)**.

1.5.4. NİŞASTA:

Nişasta, patates gibi yumrulu bitkilerde, mısır, buğday, pirinç gibi tahıllarda bulunan, suda çözünmeyen kompleks bir depo polisakkarittir. Nişasta, amiloz ve amilopektin isimli iki polimerik karbonhidratın birleşiminden oluşur. Amiloz, glukoz monomer birimlerinin α -1,4 bağlantılılarla uç uca eklenmesinden oluşur. Amilopektinde dallanmalar vardır ve ana iskelette her 24-30 glukoz monomerinden birinde α -1,6 bağlantısı ile bir yan zincir başlar.

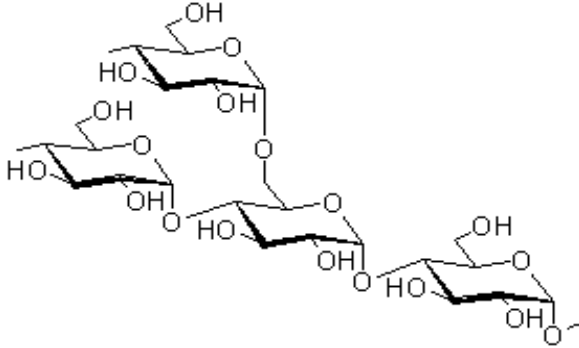
Amiloz, lineer bir moleküldür ancak birbirini izleyen glukoz birimlerinin açılı olma eğiliminden dolayı bir sarmal oluşturur. İki amiloz molekülü birbirine sarılarak bir çifte sarmal da oluşturabilirler. Bu sarmalın iç yüzeyi hidrofobik olduğu için, içinde yer alan su molekülleri kolaylıkla daha hidrofobik moleküllerle yer değiştirebilir. Nişasta testinde kullanılan iyot molekülleri amiloz sarmallarının içine dizilince mavi bir renk oluşur. Amiloz sarmalları arasında oluşan hidrojen bağları yüzünden içinde çok az su barındıran yoğun bir yapı oluşur.



Şekil 2: Amiloz'un kimyasal yapısı (<http://www.lsbu.ac.uk/water/hysta.html>)

Amilopektinde dallanma noktalarından sonra birbirine paralel iki zincir birbirlerine sarılarak bir çifte sarmal oluşturur. Amilopektin, çalı gibi, merkezden dallandıkça genişleyen bir şekle sahiptir. Dallanma noktalarında molekül düzensizdir, iki dallanma noktası arasında ise çifte sarmallar düzgün bir şekilde istiflenerek kristal bir yapı

oluşturur, bu yüzden mikroskopta nişasta taneciklerinde bu düzenli ve düzensiz bölgeler büyüme halkaları gibi görünür.



Şekil 3: Amilopektin'in kimyasal yapısı (tr.wikipedia.org/wiki/Ni%C5%9Fasta)

1.5.5. α -Amilazın Etki Mekanizması

α - Amilaz üzerinde 9 glukoz kalıntısının bağlanabileceği bağlanma merkezleri bulunur. α - (1,4) bağımlı hidrolizleyen aktif merkezin, 3-4 nolu glukoz kalıntılarının bağlandığı bağlanma merkezleri arasında kaldığı üzerinde durulmaktadır. Buna göre; hidroliz işleminden sonra, soldaki grup enzim üzerinden ayrılırsa, boşalan bağlanma merkezlerini doldurmak üzere, nişasta zinciri sola doğru kendiliğinden hareket eder ve ürün olarak G6 (maltoheksos) oluşur. Eğer hidrolizden sonra sağ tarafta ayrılma söz konusu olursa boşalan bağlanma merkezlerini doldurmak üzere sağa doğru kayma meydana gelerek ve ürün olarak G3 (maltotrioz) oluşur. Amilopektinden ise; benzer mekanizma ile maltoz (G1), maltodiyoz (G2), maltotrioz (G3), maltoheksos (G6) meydana gelir (Özdemir, 2004; Agüloğlu, 1996).

1.6. PROTEAZLAR:

Proteazlar, serin proteaz (EC. 3.4.21), sistein (thiol) proteaz (EC. 3.4.22), aspartik proteaz (EC. 3.4.23) ve metalloproteaz (EC. 3.4.24), polipeptid zincirlerinde aminoasitleri birbirine bağlayan peptid bağlarını kırarak küçük peptidler meydana getirirler (**Mc Kane ve Kandel, 1996; Nascimento ve Martins, 2004**).

Proteazlar, doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynamaktadır ve böylece besin döngüsünü sağlamakta ve ayrıca bitkilerin besinleri alabilmelerini kolaylaştırmaktadır (**Tari ve ark., 2006; Venugopal, 2006**).

Günümüzde bilimsel olarak bilinen altı sınıf proteaz vardır:

- Serin proteaz
- Threonine proteaz
- Sistein proteaz
- Aspartik asit proteaz
- Metalloproteaz
- Glutamik asit proteaz

Proteazlar tüm organizmalarda doğal olarak oluşur. Bu enzimler, yiyecek proteinlerinin basit sindiriminden yüksek seviyeye kadar düzenlenen tüm basamaklarda fizyolojik reaksiyonlarda rol alır. Peptidazlar bir proteinin aminoasit sıralanışına bağlı olarak ya belirli bir peptid bağı kırabilir ya da tüm peptidi aminoasitlere parçalayabilir (<http://www.enzymeessentials.com/HTML/protease.html>).

1.6.1. Proteazların Biyoteknolojide Kullanım Alanları:

Bakteriler tarafından üretilen proteaz enzimlerinin endüstriyel amaçlar için kullanımı yaygındır. Bakterilerin ürettikleri ekzopeptidazlar ekstraselüler proteinleri parçalar. Günümüzde mikrobiyal proteazlar özellikle deterjan üretimi, çamaşırcılık, ekmekçilik, et ürünlerinin yumuşatılması ve rekombinant DNA teknolojisinde kullanılmaktadır. Özellikle kan ve çimen lekelerinin giderilmesinde *Bacillus* cinsi mikroorganizmalardan elde edilen proteazlar kullanılmaktadır (**Gupta ve ark. 2005; Ghorbel ve ark., 2003; Corderio ve ark., 2002**).

Proteazlar arasında özellikle bakteriyel kaynaklı proteazların, hayvan ve fungal proteazlar ile karşılaştırıldığı zaman daha etkin olduğu görülmektedir (**Banerjee ve ark., 1999**). Son zamanlarda araştırmacılar, bu özelliğinden dolayı endüstriyel alanlarda kullanılmak üzere uygun proteazları üreten mikroorganizmalar üzerinde çalışmaktadır (**Özşahin, 2006; Najafi ve Sariri, 2006**).

Termofilik ve alkalifilik *Bacillus* tarafından üretilen alkalifilik proteazlar yüksek sıcaklık ve pH'ya dayanıklı olduğundan dolayı deterjan endüstrisinde en fazla kullanılan proteazlardandır. Proteazlar, deterjan sanayisi gibi geniş uygulama alanlarında kullanıldıklarından dolayı çok önemli endüstriyel enzimlerdir (**Gupta ve ark, 2005; Beg ve Gupta, 2003; Sookkheo ve ark., 2000**). Günümüzde deterjan endüstrisi, yıkama sıcaklığının düşürülmesi ve deterjan kompozisyonunun değişmesi yönünde çalışmalar yapılmakta, fosfat tabanlı deterjanları uzaklaştırarak, deterjan uygulamaları için daha uygun yeni proteazlar üzerinde durmaktadır (**Özşahin, 2006**). Alkalen proteazları üreten *Bacillus* 'ların çok geniş ve çeşitli ortamlardan izolasyonunun sağlanabilmesi, bununla birlikte hem kompleks hem de sentetik ortamda gelişebilmekte olmalarından ötürü biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır (**Kaur ve ark., 2001; Johnvesly ve Naik 2001**).

Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır. Proteazlar, çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentezlerde ve atıkların muamelesinde kullanılmaktadır (**Tari ve ark., 2006; Özşahin, 2006; Sookkheo ve ark., 2000; Atlas, 1995**).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yılmaz (2005), topraktan bazı *Bacillus* türleri izole etmiş ve bu bakterilerin antimikrobiyal aktivitelerini araştırmıştır. Toplam 29 *Bacillus* izole etmiş ve bu bakterilerin Gram pozitif ve negatif özelliklerini ve bazı antibiyotiklerin bu bakterilere etkilerini belirlemiştir.

Mercan ve ark. (2002), *Bacillus sphaericus*'a ait toplam 21 suşun 20 değişik antibiyotiğe olan duyarlılıklarını ölçmüşlerdir. İnhibisyon zonu çapları milimetre cinsinden ölçmüşlerdir.

Aslım ve ark. (2000), değişik toprak örneklerinden *Bacillus* bakterilerini izole ederek antibiyotik hassasiyetini ölçmüşlerdir. Buna göre, izolatların % 93'ü tetrasikline, % 97 'si kloramfenikole duyarlılık gösterirken, bütün suşların penisilin G'ye karşı direnç gösterdiğini belirlemiştir.

Derekova ve ark. (2007), Rupi Basın (Bulgaristan)'deki sıcak su kaynağından izole edilen yeni termofilik *Bacillus* üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Bu izolatların Gram pozitif, spor oluşturan, termofilik, zorunlu aerobik olduklarını ve 16 S rRNA analizi ile *Anoxybacillus* cinsi bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir.

Poli ve ark. (2006), Rittmann dağından bakteri izole etmişlerdir ve bu bakterilerin spor oluşturan, aerobik, termofilik olduğunu ve bakterilerin büyüme sıcaklığını ve pH'sını sırasıyla 45 °C-55 °C (optimum 61 °C) ve pH 5,0-6,5 (optimum 5.6) olarak bulmuşlardır. Bu bakterilerin 16 S rRNA analizi ile *Anoxybacillus amylolyticus* olduğunu ve amilolitik özellikte olduklarını bulmuşlardır.

Kevbrin ve ark. (2005), jeotermal kaynaklarından termofilik bakteri izole etmişlerdir. İzole edilen bakterilerin spor oluşturan, hareketli, fakültatif aerob, Gram pozitif, çubuk şeklinde bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir. 16 S rRNA analizi ile bu bakterinin *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. olduğunu bulmuşlardır. Bakterinin optimum büyüme sıcaklığının 60 °C ve pH'nın 6,8-8,5 olduğunu belirlemiştir.

Beldüz ve ark. (2003), Türkiye'nin Balıkesir ve Ağrı illerinin sırasıyla Gönen ve Diyadin sıcak su kaynaklarının çamur ve su örneklerinden birbirine yakın xylanolitik, termofilik *Anoxybacillus* cinsi yedi adet bakteri izole etmişlerdir. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenen bu izolatların, glukoz, nişasta, xylose ve mannitol dahil olmak üzere geniş bir karbon kaynağı alanı üzerinde büyüyen termofilik (büyüme için optimum sıcaklık 55 °C-60 °C arasında), fakültatif anaerob bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir.

Hawumba ve Brozee (2002), Kuzey Uganda'daki sıcak su kaynaklarından *Geobacillus* cinsi termofilik mikroorganizmalar izole ederek bu mikroorganizmaların proteolitik, aerobik, çubuk şeklinde, Gram pozitif, spor oluşturan bakteriler olduğunu ve 16S rRNA analizleriyle *Geobacillus* cinsi bakteriler olduğunu belirlemişlerdir. Bu bakterilerin optimum üreme koşullarının 60 °C-62 °C ve pH 7,5-8,5 olduğunu, termostabil proteaz üretilen üretilmediklerini araştırarak enzimin optimum koşullarını belirlemişlerdir.

Kıran ve Arıkan (2006), *Bacillus sp.* suşlarında antibiyotik selüloz ve amilaz üretiminden sorumlu genlerin protoplast transformasyon tekniği ile Gram (+) bakterilere transferi ve ekspresyon düzeyini araştırmışlardır ve izole ettikleri bakterilerin Gram boyama ve biyokimyasal özelliklerine göre *Bacillus sp.* olduklarını tespit etmişlerdir.

Berber ve Yenidünya (2005), Van Gölü ve çevresindeki topraklardan izole edilen toplam on yedi yerel alkalofilik *Bacillus* izolatını, beş referans *Bacillus* türü ile fenotipik özelliklerini belirleyerek ve elde edilen ekstraselüler protein profillerine göre tanımlamışlardır. Fenotipik özelliklerine göre, yerel izolatların tümünün Gram (+), aerobik, endospor oluşturan, hareketli ve fakültatif alkalofilik *Bacillus* cinsine ait türler olduğu belirlenmiştir.

Mutzel ve ark., (2004), *Bacillus sp. A2* olarak adlandırılan termofilik bakteriyi, İzlanda'da sıcak bir su kaynağının su ve çamur örneğinden izole etmiştir. Aerobik izolatın optimum büyüme sıcaklığının 65 °C ve *Bacillus sp. A2*'nin Gram (+), spor oluşturan çubuk şeklinde olduğunu belirlemiştir. 16S rRNA analizine göre *Bacillus sp. A2*'nin *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus kaustophilus* ve *Bacillus thermoleovorans*'a yakın olduğunu tespit etmiştir.

Caccamo ve ark. (2000), İtalya'da Vulcano Adası'ndaki hidrotermal kaynaklardaki sedimentlerden bakteri izole etmişlerdir. Bu bakterilerin fenotipik ve moleküler analizlerini yapmışlardır ve bunların spor oluşturan, termofilik yeni *Bacillus* türü bakteriler olduklarını tespit etmişlerdir.

Logan ve ark. (2000), Rittmann dağı ve Melbourne dağı toprak örneklerinden bakteri izole etmişlerdir ve bu bakterilerin spor oluşturan, aerobik, termofilik olduklarını ve bakterilerin optimum büyüme sıcaklığını 50 °C ve pH'sını 5,5 olarak bulmuşlardır.

Kıran ve ark. (2005), termofilik *Bacillus* sp. K-12'nin, amilaz üretimi üzerine karbon kaynakları ve çeşitli kimyasalların etkisini araştırmışlardır. *Bacillus* sp. K-12 suşu Kahramanmaraş'ta bulunan Zeytinli Ilıcası'ndan alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir. Enzim üretimi 20 °C-55 °C sıcaklıkları arasında gerçekleşirken enzim üretimi için optimum sıcaklık 42 °C olarak bulunmuştur. Amilaz üretimi 4,5-10,5 pH aralıklarında değişimler göstermiştir. Maksimum α -amilaz üretimi %1 nişasta içeren besiyerinde 60. saatte elde edilmiştir. MnSO₄, ZnSO₄ ve EDTA, *Bacillus* sp. K-12'nin amilaz üretimini inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Kıran ve ark. (2003), su ve toprak örneklerinden 65 *Bacillus* suşu izole etmiş ve bu suşların α -amilaz üretme yeteneklerini araştırmıştır ve buna göre en iyi aktivite gösteren suşu seçerek kültür ortamının optimum sıcaklığını 42 °C, optimum pH'yı 9,5 olarak belirlemiştir.

Bahçeci (2004), Tuz gölünden izole edilmiş onbir bakterinin yağ asidi metil ester profillerine göre kesin tanısını yapmıştır. İzolatların endüstriyel öneme sahip ksilanaz, selülaz, alfa-amilaz ve proteaz enzimlerini üretilip üretilmediklerini belirlemiştir. Bu enzimlerin aktivitesi, stabilitesi, optimum sıcaklık ve optimum pH değerlerini bulmuştur. Bir izolatin *Bacillus pumilus*, iki izolatin *Bacillus subtilis* ve diğer izolatların *Bacillus licheniformis* olduğunu tespit etmiştir. İzolatların amilaz ve proteaz enzimini önemli miktarlarda ürettiği belirlenmiştir. Enzimlerin optimum sıcaklıkları ve optimum pH değerlerinin 60 °C-80 °C ve 7,0-8,0 olduğu saptanmıştır. Amilazların pH 9 ve 80 °C limitine kadar önemli miktarda stabilite gösterdiği ve bütün izolatların önemli miktarlarda proteaz enzimi ürettikleri belirlenmiştir. İzolatların proteaz enzimlerinin optimum sıcaklıkları ve optimum pH değerleri 50 °C-60 °C ve 7,0-7,4 olarak tespit

edilmiştir. Proteazların da pH 9 ve 80 °C limitine kadar önemli miktarda stabilite gösterdiği belirlenmiştir.

Asgher ve ark. (2006), nişasta işlemek amacıyla termofilik *Bacillus subtilis*'ten termostabil amilaz elde etmişlerdir. Maksimum enzim üretiminin 72 U/ml olarak 48. saatte, pH 7'de 50 °C'de olduğunu belirlemişlerdir. Enzim aktivasyonunun Ca^{+2} ile arttığını Co^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} iyonları varlığında tamamen inhibe olduğunu ve Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} iyonlarının varlığında ise kısmen inhibe olduğunu bulmuşlardır.

Najafi ve ark. (2005), topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* AX20'den ürettikleri ekstraselüler α -amilaz enziminin homojenizasyonunu ve saflaştırılmasını gerçekleştirerek optimum sıcaklığını 55 °C, optimum pH'sını 6 olarak belirlemişlerdir. Enzim aktivitesi üzerine ağır metallerin etkisini araştırarak Hg^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+2} iyonları ve EDTA ile inhibisyona uğrattığını belirlemişlerdir.

Condeiro ve ark. (2002), termofilik *Bacillus sp.*'dan α -amilaz üretiminin 48. saatte, enzim aktivitesinin optimum sıcaklığının 70 °C ve optimum pH'sının 7,5 olduğunu ve enzim aktivitesi üzerine bazı ağır metallerin etkisini araştırarak Ba^{+2} , Co^{+2} ve Cu^{+2} 'nin inhibisyon etkisinin Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ni^{+2} , Sr^{+2} , Mn^{+2} 'den daha etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Sarikaya ve Gürgün (2000), *Bacillus* suşlarından amilaz enzimini yüksek verimde elde etmek için yeni bir ortam geliştirmişlerdir. Alfa amilaz için tüm suşlarda optimum sıcaklığın 55 °C, *B. subtilis* için optimum pH 7, *B. amyloliquefaciens*'in her iki suşu için ise 5,9 olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin düşük ya da yüksek pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıkta stabil olmadığını belirlemişlerdir. Ag, Zn ve Cu'nun tüm suşlarda güçlü olarak inhibitör etki gösterdiğini bulmuşlardır.

Mamo ve ark. (1999), termofilik *Bacillus subtilis*'den elde ettikleri ekstraselüler α -amilaz enziminin aktivitesinin optimum sıcaklığının 75 °C-80 °C ve pH'sının 5,5 olduğunu belirleyerek, enzim aktivasyonunun Hg^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} iyonları tarafından inhibisyona uğradığını ve Zn^{+2} iyonunun inhibisyona yol açmadığını belirlemişlerdir.

Bolton ve ark. (1997), *Bacillus flavothermus*' a ait α -amilazı saflaştırmaya yönelik amonyum sülfat çöktürmesi, iyon- değişim kromatografisi ve jel filtrasyon işlemlerini gerçekleştirerek, enzimin maksimum aktivitesini pH 5,5-6,0 ve 60 °C olarak belirlemişlerdir.

Stefanova (1992), termofilik *Bacillus sp.*'den elde ettiği termostabil amilaz enziminin karakterizasyonu üzerinde çalışmalar yapmıştır ve Ca^{+2} , Na^{+2} iyonlarının enzim stabilizasyonunu arttırdığını bulmuştur.

Arulmani ve ark. (2007), *Bacillus laterosporus*'dan serin proteaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Enzimin optimum 75 °C ve pH 9'da aktivite gösterdiğini, PMSF ile inhibe edildiğini, Ca^{+2} , Mg^{+2} iyonlarının varlığında ise aktivitenin arttığını tespit etmişlerdir.

Lee ve Jahng (2005), termofil, aerobik, spor oluşturan bakteri izole etmişler ve bu bakterilerin *Bacillus* cinsi bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir. Elde ettikleri izolatların proteolitik özellik gösterdiğini bulmuşlardır.

Park ve ark. (2004), dört farklı proteolitik bakteri izole etmişlerdir. Bu bakterilerin biyokimyasal testler ve 16S rRNA analizleri yardımıyla *Bacillus* cinsi (*B. subtilis*, *B. aeromonas*, *B. hydrophila*, *B. amyloliquefaciens*) bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir. Proteolitik aktivitelerinin optimum sıcaklık ve pH'larının sırasıyla 40 °C -70 °C ve 8,0-8,5 arasında olduğunu belirlemişlerdir. PMSF ile kısmi olarak proteolitik aktivitenin kaybolduğunu bulmuşlardır.

Nascimento ve Martins (2003), termofilik *Bacillus* türü bakterinin ekstraselüler proteaz enzimi üretme yeteneğine, bu enzimin özelliklerini belirleme ve saflaştırılmasına yönelik araştırmalar yapmışlardır. Proteaz enziminin optimum 24. saatte, 60 °C, pH 8'de üretildiğini ve K, Hg^{+2} , Cu^{+2} iyonlarının bulunduğu durumda enzim aktivasyonu üzerinde bu iyonların inhibitör etkisinin olduğunu Mn^{+2} , Ca^{+2} iyonlarının ise enzim aktivasyonunu stimule ettiğini bulmuşlardır.

Ghorbel ve ark. (2002), *Bacillus* tarafından üretilen proteaz enziminin stabilitesi üzerinde çalışmalar yapmışlar ve optimum proteaz aktivitesi sıcaklığını 60 °C, optimum pH'sını 8 olarak bulmuşlardır. Ayrıca Ca^{+2} (2 mM) aktivitenin artışını sağladığını, Zn^{+2} ve Cu^{+2} 'nin inhibitör etkisinin olduğunu, EDTA tarafından aktivitenin tamamen kaybolduğunu tespit etmişlerdir.

Beg ve Gupta (2002), *Bacillus mojavensis* tarafından üretilen serin alkalin proteaz enziminin karakterizasyonu ve saflaştırılması üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Enzimin aktivasyonunun optimum sıcaklığını 60 °C, optimum pH'sını 8 olarak bulmuşlardır. Metal iyonlarından Cu^{+2} ve Mn^{+2} 'nin enzim aktivitesinde % 36'lık artış sağladığını, PMSF'nin enzimi inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Johnvesly ve Naik (2001), termofilik ve alkalofilik *Bacillus* sp.'den termostabil proteaz üretimi üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Proteaz aktivitesinin optimum sıcaklığını 70 °C ve optimum pH'nın 7 olduğunu tespit etmişlerdir. 1mM PMSF ve 10 mM Fe⁺², Hg⁺², Zn⁺² ile proteaz enziminin aktivitesini yitirdiğini, 10 mM Mn⁺², Mg⁺², Cu⁺², Co⁺² iyonları ile aktivitenin arttığını tespit etmişlerdir.

Sookkheo ve ark. (2000), *Bacillus stearothermophilus* tarafından üretilen üç ekstraselüler proteaz enziminin lizin affinite kromatografisini, iyon değişim kromatografisini ve jel filtrasyonunu gerçekleştirmişlerdir ve enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklıkları 70 °C, 85 °C, 90 °C olarak ve optimum pH'yı da 7,0 olarak belirlemişlerdir. Enzim aktivitesi üzerinde 5 mM CaCl₂'nin aktivite artış sağladığı ve EDTA'nin inhibisyona sebep olduğunu belirlemişlerdir.

Zvidzai ve Zvauya (2000), Zimbabve sıcak su kaynaklarından *Bacillus subtilis* izole etmişlerdir ve bu bakterilerin ürettikleri proteaz enzimi üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Proteaz aktivitesinin sıcaklık ve pH aralığını sırasıyla 60°C -80 °C ve 6-10 olarak test etmişler ve optimum koşullarının 70 °C ve pH 8 olduğu belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin 2,5 mM PMSF ile Ag⁺² ve Hg⁺² kaybolduğunu, ayrıca Mn⁺², Mg⁺², Fe⁺² iyonlarının varlığında %20 aktivite artışı sağlandığını belirlemişlerdir.

Matta ve Punj (1998), *Bacillus polymyxa* B-17'ten elde ettikleri termostabil proteaz enzimini amonyum sülfat presipitasyonunu ve jel filtrasyonunu gerçekleştirerek enzimin optimum koşullarını belirlemişlerdir. Buna göre; proteaz aktivitesinin optimum sıcaklığı 70 °C ve pH aralığını 5,5-10'da deneyerek optimum pH'yı 7,5 olarak bulmuşlardır. Enzim aktivasyonuna çeşitli metaller ve metal bağlayıcı ajanların etkisini araştırarak Cu⁺² ve EDTA'nın inhibitör etkisinin olduğunu ve Na⁺, K⁺, Mg⁺², Co⁺²'nin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir.

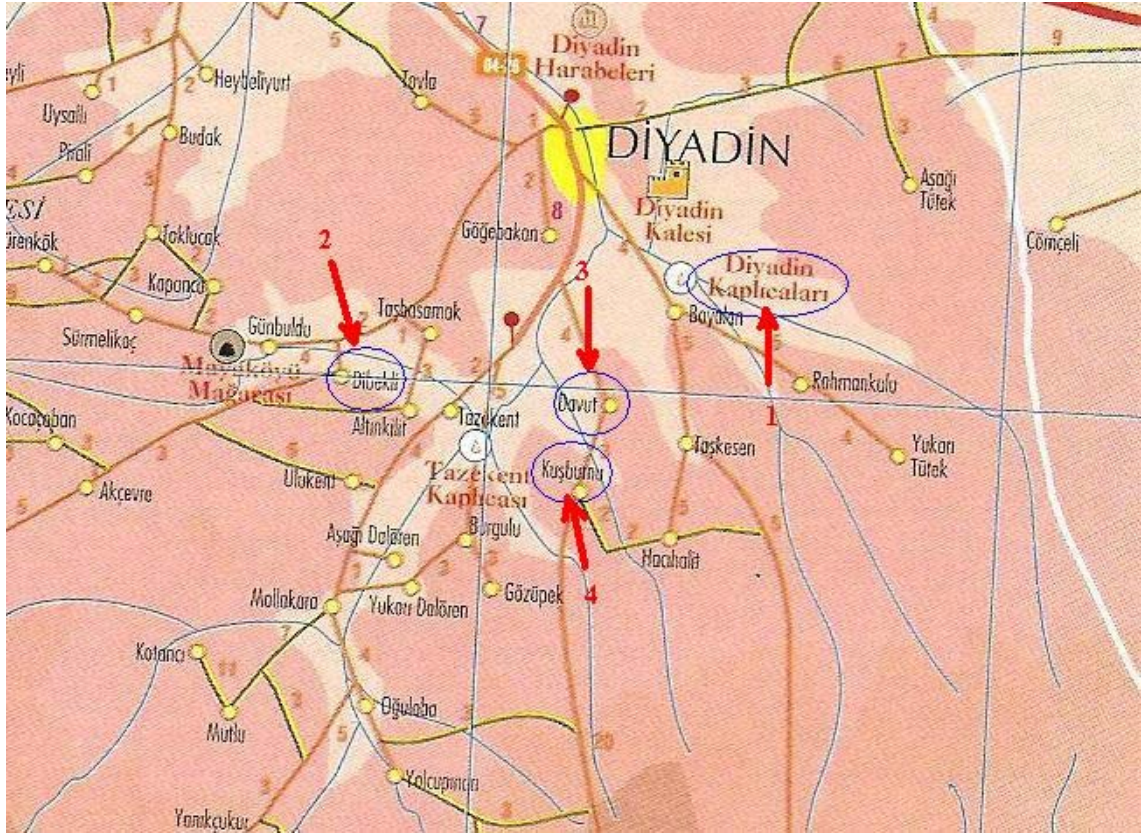
Tsuchya (1991), Proteolitik aktivite gösteren serin proteaz aktivitesi üzerine, PMSF, metal iyonları, Cu²⁺ ve Hg²⁺'in aktif alan engelleyicileri olduğunu belirlemişlerdir. Optimum pH'nın (37 °C'de) 11,5-13,0 ve optimum sıcaklığın (pH 11,5'te) 70 °C olduğunu belirlemişlerdir. 5mM CaCl₂'nin varlığında 80 °C'de maksimum proteolitik aktivite sağlandığını ve pH 11.5'te 75 °C'nin altında stabilite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL METOD

3.1. Biyolojik Materyal

Bu araştırmada, aşağıda belirtilen Diyardin (Ağrı) kaplıcalarından alınan su ve çamurlu su örneklerinden izole edilen bakteriler kullanılmıştır.

Diyardin Kaplıcaları: Diyardin İlçesi'nin 5 km güneyindedir. Köprü, Dibekli, Davut ve Kuşburnu Köyü ermikleri adlarını alan sıcak su kaynaklarından oluşur. Kaplıcalar birbirlerine yeterince uzakta yer alırlar.



şekil 4: Ağrı ili Diyardin ilçesi sıcak su kaynakları (İlker, 2004)

• **Köprü ermiği:** Merkezi kaplıca tesislerinin 500 m. kuzey batısında ve Diyardin'e 7 km uzaklıktadır. Bölgede bulunan diğer sıcak su kaynaklarına göre en sert araziye sahiptir. Bunun sebebi, çok sayıda kaynaktan çıkan suyun hava ile temasa geçmesi sonucunda yapısındaki kireç, kükürt ve benzeri maddelerin taşlaşarak st üste birikmesidir.

Köprü ermiğinin su sıcaklığı 50°C ve pH'sı 7,4'tür. Su 30 m. açıktan sonra bina içine alınmıştır. Havuz ve binası Davut ermiğinin aynısıdır. Sudaki

mineral oranı fazla ise de içilebilir niteliktedir. Sular traverten oluşturduğu için Peri bacalarını ve Denizli - Pamukkale'yi andırmaktadır.



Resim 1: Köprü Çermiği

- **Dibekli Köyü Sıcak Su Kaynağı:** Diyardin'e 15 km uzaklıktadır. Su sert bir araziden akmaktadır. Suyun sıcaklığı 50 °C ve pH'sı 7,6'dır.



Resim 2: Dibekli Köyü Sıcak Su Kaynağı

- **Davutlu Çermiği:** Davut Köyü'ne yakın Diyardin'e 20 km uzaklıktadır ve bu köyden gelen suyun kenarında olduğu için "Davut çermiği" adını almıştır. Su bol minerallidir, bikarbonat, kalsiyum, kükürt, hidrojen, sülfür ve karbondioksit bulundurur ve içinde az miktarda magnezyum vardır. Diğer sıcak su kaynaklarına göre sıcaklığı en fazla olandır. Sıcaklığı 78°C ve pH'sı 7,7'dir. Kapalı ve sulu yaralara, mide hastalıklarına, romatizmaya şifa verir.



Resim 3: Davutlu Çermiği

- **Kuşburnu Köyü Çermiği:** Diyardin'e 23 km uzaklıktadır. Su, arazi içinde bir çok noktadan rastgele çıkmaktadır. Suyun sıcaklığı 70°C ve pH'sı 7,5'tir.



Resim 4: Kuşburnu Köyü Çermiği

3.2. Kimyasal Maddeler

Nutrient Broth, OXOID'den ve agar, ATABAY'dan temin edilmiştir.

Deterjanlardan SDS, MERCK DARMSTAG'dan elde edilmiştir.

Elektroforetik Maddeler; Tris-Base[Tris(hydroxymetyl) amino methane], akrilamid, N-N-Metilen bisakrilanid, TEMED (N-N-N'-N'-Tetrametiletillen diamin), APS (amonyum persülfat), standart proteinler (ticari α -amilaz) ve glisin, SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS 'den, coomassie brilliant blue R-250, BIO-RAD 'dan, BFB (Brom Fenol Blue), SDS (sodyum dodesil sülfat) ve Gliserol, MERCK DARMSTAG'dan temin edildi.

3.3. Besi Yerleri

3.3.1. Sıvı besiyeri (Nutrient Broth [NB]) :

25 g NB ve distile su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlandı.

3.3.2. Katı besiyeri

25 g Nutrient Broth besiyerine 15 g agar ilave edilip distile su ile 1 litreye tamamlanıp otoklavlandı.

3.4. Tamponlar

- pH:4, pH:5 ve pH:6 tamponlarını hazırlamak için; 0,1 M sitrik asit hazırlandı.
- pH:7, pH:8 ve pH: 9 tamponlarını hazırlamak için; 0,1 M. tris- HCl hazırlandı.
- pH:10, pH: 11 tamponlarını hazırlamak için; 0,1 M karbonat / bikarbonat tamponu hazırlandı.

3.5.Boya maddeleri:

Gram boyama için;

Kristal viyole, lugol, % 96'lık alkol, sulu fuksin kullanıldı.

Spor Boyama için;

Müzerelli spor boyası, % 10'luk nitrik asit, %1'lik eosin kullanıldı.

3.6. Kullanılan Aletler:

İnkübatör (Sanyo)
Steril Kabin (Telstar AV-100)
Spektrofotometre (Pharmaci 4 KB Novaspec II)
Çalkalayıcı (Julobo)
Soğutmalı Santrifüj (Sigma Christ 2K15)
Vorteks (Stuart)
Magnetik Karıştırıcı (Stuart)
Etüv (Heraus)
Dijital Göstergeli Hassas Terazi (GEC, AVERY, 0,0001)
Otoklav
Su Banyosu (Grant 6G, -20, +100 °C)
pH metre (Jenvay 3010, PCP J01 elektrod)
Sterilizatör (Heraus)

3.7. Bakteri İzolasyon İşlemi ve Saf Kültür Bakteri Üretimi:

Bu amaçla 10 gr toprak steril koşullarda 90 ml steril su içeren erlenlere aktarılarak 10^{-1} lik seyreltmeler elde edilmiştir. Karışımların çalkalanarak homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra benzer şekilde ardışık transferler yapılarak 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} lik dilüsyonlar sağlanmıştır.

Farklı oranlarda seyreltilmiş süspansiyonlardan 1 ml alınarak steril Petri kutularına aktarılmış, üzerlerine besiyerlerinden 20 ml ilave edilerek homojenizasyonları sağlanmıştır. Mikroorganizmaların izolasyonunda yukarıdaki işlem gerçekleştirilmeden önce seyreltilmiş süspansiyonlar 80 °C'de 10 dakika ısıtılma tabii tutulmuşlardır. Spor oluşturan mikroorganizmalar bu işlem sonucunda canlılıklarını korurken spor morfolojisi oluşturmayan diğer mikroorganizmalar ölmektedirler. Yukarıda belirtilen işlemler her seyreltilmiş süspansiyondan 10 petri kutusuna ekim yapılacak şekilde gerçekleştirilmiş, ekim yapılmış petri kutuları termotolerant mikroorganizmaların izolasyonu için 55°C'de 2-5 gün inkübe edilmişlerdir.

Sulardan izolasyon için öncelikle su örneğinden besiyerine inokule edildi ve termotolerant mikroorganizmaların izolasyonu için de 55°C'de inkübasyona bırakıldı.

24 saatlik inkübasyon sonunda zenginleşmiş kültürden katı besiyerlerine çizgi ekim yaparak saf kültürleri elde edildi.

NB sıvı besi yerine, katı besi yerinden platin öze yardımıyla ekim yapıldı. Çalkalayıcıda 200 rpm'de, 55 °C 'de, 24 saat inkübe edildi.

3.8. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması:

100 ml NB sıvı besiyeri (pH 7) hazırlanarak otoklavlandı, elde edilen izolatlardan 1 ml ayrı ayrı bakteri ekimi yapıldı ve 55 °C'de, 160 rpm'de çalkalayıcıda bekletildi ve 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 64. saatlerde üretilen bakterilerin 470 nm'de spektrofotometrede absorbansları ölçüldü.

3.9. Sıcaklığın Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması:

100 ml NB sıvı besiyerine (pH 7) 1 ml izolatlardan ayrı ayrı bakteri ekimi yapıldı ve 15-20-25-30-35-40-45-50-55-60-65-70-75 °C'de her izolat için optimum üreme zamanında, 160 rpm'de çalkalayıcıda bekletildi ve 470 nm'de spektrofotometrede absorbansları ölçüldü.

3.10. pH'nın Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması:

100 ml NB sıvı besiyerleri pH 4,5-5-5,5-6-6,5-7-7,5-8-8,5-9-9,5-10-10,5-11 olacak şekilde ayarlanarak otoklavlandı ve 1 ml izolatlardan ayrı ayrı bakteri ekimi yapıldı. Her izolat için optimum üreme zamanı ve sıcaklığında 160 rpm'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı ve 470 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı.

3.11. Gram Boyama:

Katı besiyeri NB'de gecelik üretilen bakteri örneklerinden öze yardımıyla koloni alınarak temiz lamın bir kenarına serum fizyolojik damlatılıp kolonilerin yayma işlemi gerçekleştirildi ve preparat kurutulup, alevden geçirilerek tespit edildi. Elde edilen preparat üzerine kristal viyole solüsyon dökülerek 2 dakika bekletilerek boyanması sağlandı ve daha sonra su ile yıkandı. Preparat üzerine lugol dökülerek 1 dakika bekletildi ve yıkandı. Deklorizasyonu sağlamak amacıyla % 96'lık alkol döküldü 15- 20 sn. bekletildi ve yıkandı. Son işlem olarak sulu fuksin ile 2 dakika bekletildi ve su ile

yıkılarak boya giderildi. Preparatlar kurutma kağıdında kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifi altında inceleme yapıldı.

3.12. Spor boyama:

Katı besiyeri NB'de gecelik üretilen bakteri örneklerinden öze yardımıyla koloni alınarak temiz lamın bir kenarına serum fizyolojik damlatılıp kolonilerin yayma işlemi gerçekleştirildi ve preparat kurutulup, alevden geçirilerek tespit edildi. Elde edilen preparat üzerine müzerelli spor boyası dökülerek 5 dakika alttan ısıtılarak bekletildi. Bu aşamada preparatların yanmamasına dikkat edildi. Preparat yıkandıktan sonra %10'luk nitrik asitle 10 sn. muamele edilerek dekolorize edildi ve su ile yıkama işlemi yapılarak %1'lik eosin ile 2 dakika bekletildikten sonra boya döküldü, yıkandı, kurutuldu ve immersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifi altında inceleme yapıldı.

3.13. Biyokimyasal Testler :

3.13.1. Nişasta Hidrolizi Testi:

Bu test, mikroorganizmaların nişastayı bazı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ekstraselüler amilaz enzimi tarafından parçalanıp parçalanmadığını ortaya koymak amacıyla yapılır. Bunun için petri kutularına hazırlanmış %3'lük nişastalı agar (pH 7) döküldü ve katı besi yerlerinde üretilen izolatlardan ayrı ayrı bakteri çizgi ekimi yapıldı ve her izolat için optimum sıcaklıkta 2-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda agarların üzeri 0,5 g I₂ ve 1g KI (150 ml) ile hazırlanan solüsyonla kaplandı ve reaksiyon 5 dakika içinde değerlendirildi.

3.13.2. Jelatin Hidrolizasyon Testi:

Bu test mikroorganizmaların, jelatini hidrolizleyen jelatinaz enzimi sentezleyip sentezlemediklerini ölçmek için yapılır. Bunun için %10 jelatin içeren besiyeri hazırlandı, saf ve taze kültürden mikroorganizma ekimi yapıldı. Besiyerleri her izolat için optimum sıcaklıkta 10 gün kadar inkübe edildi. Bu süre sonunda kontrollerle birlikte buzdolabında 1-2 saat bırakıldı. Erimenin olup olmadığı gözlemlendi.

3.13.3. Katalaz Testi:

Bu test, mikroorganizmaların katalaz enzimi sentezleyip sentezleyemediklerini saptamak amacıyla yapılır. Bunun için taze haldeki (18-24 saatlik) mikroorganizma kültürleri (katı) kullanılarak yavaş yavaş %3'lük taze hazırlanmış hidrojen peroksit ilave edildi ve incelendi. Hidrojen peroksit ilavesinden sonra kolonilerin bulunduğu yerlerde kabarcıklar görülürse katalaz enziminin sentezlendiği, eğer hava kabarcıkları görülmezse katalaz enziminin sentezlenmediği sonucuna varılır.

3.13.4. Kazein Hidrolizi:

Bu test, mikroorganizmaların süt proteinini oluşturan kazeini proteaz enzimi vasıtasıyla hidrolizleyip hidrolizleyemediklerini tespit etmek amacıyla kullanılır. Bunun için; %10 skim milk bulunan besi yeri hazırlandı ve taze kültür ekilerek bir gün süreyle optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kolonilerin etrafında şeffaf zonların oluşup oluşmadığına bakıldı. Zonları daha iyi tespit edebilmek için %1'lik HCl damlatılarak inceleme yapıldı.

3.13.5. Üreaz Testi:

Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidroliz eden üreaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini tespit etmek için kullanılır. Bu test bakterilerin cins ve tür tayininde kullanılır. Bunun için; üre agarlı besi yeri tüplerde hazırlandı. Taze kültüre edilmiş mikroorganizmalar besi yerine ekim yapıldı ve 2-5 süreyle mikroorganizmaların optimum sıcaklık derecesinde inkübasyona bırakıldı ve renk değişimi olup olmadığı gözlemlendi.

3.13.6. Lipaz Testi:

Bu test, mikroorganizmaların yağları parçalayan lipaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini tespit etmek için kullanılır. Bunun için; 0,75 gr et özütü, 1,25 gr pepton, 3,79 gr agar ve 2,5 gr tereyağı içeren besi ortamı (250 ml) hazırlanıp otoklavlandıktan sonra her bir izolatın taze kültüründen ayrı ayrı ekim yapılarak her biri için optimum sıcaklıkta 1 gün süreyle inkübasyona bırakıldı ve ertesi gün oluşan kolonilerin bulunduğu petri kabına aşırı doygun CuSO_4 çözeltisi damlatıldı. Mat yeşilimsi saha lipaz üretimini gösterir.

3.14. Hareket Testi:

Bu test mikroorganizmaların hareket yeteneklerinin olup olmadığını belirlemede kullanılır. Bunun için; % 0,4-0,5 berrak yarı katı agarlı besiyeri buyyon tüpleri içinde kapiler tüplerin bulunduğu besi ortamına dökülür. İzolatların gecelik taze kültürlerinden tek koloni iğne öze yardımıyla alınarak kapiler tüp içerisine daldırmak suretiyle ekim yapılır ve her izolat için optimum sıcaklıkta 24 veya 48 saat inkübasyona bırakılır. Eğer besiyerinin inokülasyon hattı boyunca üreme var ancak sağa sola doğru yayılma ve dallanma yoksa mikroorganizma hareketsiz kabul edilir, fakat inokülasyon hattından etrafa doğru agarın içine doğru bir yayılma gözlenirse hareketli kabul edilir.

3.15. Antibiyotiklere Karşı Duyarlılık Testi:

Bu test mikroorganizmaların anitibiyotiklere karşı gösterdikleri özellikleri belirlemek için yapılır. Bu test için; izolatların üreyebilmesi amacıyla uygun besi ortamına (NB-katı) bakterilerin taze kültürlerinden yayma ekim yapıldı ve Amoxycilin Clawlanic Asid (AMC) 30 µg, Netilmicin (NET) 30 µg, Ofloxacin (OFX) 5 µg, Imipenem (IPM) 10 µg antibiyotiklerinin bulunduğu diskler ekim yapılan yüzeye bırakıldı ve izolatlar için belirlenen optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda antibiyotik disklerin etrafında zon oluşup oluşmadığı gözlemlendi ve zon büyüklüğü ölçüldü.

3.16. Enzim Aktivite Tayinleri:

İzolatların üreyebilmesi için uygun besi ortamına (NB-sıvı) bakterilerin taze kültürlerinden ekim yapıldı. 24 saat inkübasyon sonunda besi yeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı, enzim aktivite deneylerinde kullanıldı.

3.16.1. Amilaz Enzimi Aktivite Tayini (Bernfeld Yöntemi, 1955):

Enzim aktivitesi Bernfeld yöntemine göre belirlendi (Bernfeld, 1955). Bu yöntemde göre 100 µl enzim çözeltisi (üst sıvı) ve 200 µl % 0.5'lik nişasta çözeltisi (1 nolu izolat için 0,1 M pH 8 Tris-HCl ve 3 nolu izolat için 0,1 M pH 7 Tris-HCl tamponu içerisinde çözünmüş olarak hazırlandı) 50 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için, 400 µl DNS (3,5 dinitro salisilik asit) ilave edilerek 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi.

DNS, düşük sıcaklıklarda indirgen şeker uçlarıyla reaksiyona girmediğinden kaynar su banyosuna konuldu. 3,5 Dinitro salisilik asit sıcakta şekerlerin indirgen uçlarıyla reaksiyona girerek reaksiyonun durmasını sağladığı gibi aynı zamanda renk oluşumunu da sağlamaktadır. Daha sonra 3 ml distile su ile seyreltme yapılarak 489 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

α -amilaz için 1 Ünite Enzim: 1 μ mol nişastayı 30 dakikada maltoz birimlerine parçalayan α -amilaz enzim miktarıdır (U/mg).

Bernfeld Reaktifinin Hazırlanması: 20 g 3,5 dinitro salisilik asit 400 ml distile su içinde çözüldü. Başka bir beherde 32 g / 300 ml NaOH çözeltisi magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra yavaş yavaş 3,5 dinitro salisilik asit üzerine eklendi. Bir süre sıcak su banyosunda bekletildi. Sonra 600 g Na-K-Tartarat azar azar eklendi. Hacim saf su ile 2000 ml'ye tamamlandı (Bernfeld, 1955).

3.16.2. Proteaz Enzimi Aktivite Tayini (Leighton ve ark., 1973):

Leighton ve ark. (1973) göre yapılan proteaz aktivite tayininde 500 μ l azokaein substrat olarak kullanıldı, üzerine 250 μ l enzim eklendi ve 50 °C'de 30 dk. inkübe edildi. Reaksiyonun durdurulması için 2 ml TCA (trikloroasetikasit) çözeltisi eklendi ve 15 dk 4 °C'de bekletildikten sonra 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek üst sıvıdan 400 μ l süzüntü alındı, üzerine 800 μ l 1,8 M NaOH eklendi ve 420 nm'de absorbans ölçüldü.

Proteaz için 1 Ünite Enzim: 1 μ mol azokazeini 30 dakikada aminoasitlerine parçalayan proteaz enzim miktarıdır (U/mg).

Azokazeinin Hazırlanması: 0,1 M karbonat/ bikarbonat tamponu içerisinde %5'lik azokazein çözünerek hazırlandı.

3.17. Amilaz ve Proteaz Enzimleri Aktivitesi Üzerine Değişik İnkübasyon Sürelerinin Araştırılması:

100 ml sıvı besiyerinden (pH:7) her birine 1'er ml bakteri ekimi yapıldı ve bakterilerin her biri için optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Sonra 48. saate kadar her 4 saatlik süre sonunda Bernfeld (1955) yöntemine göre α -amilaz aktivite tayini ve Leighton ve ark. (1973) göre proteaz enzimi aktivitesi ölçüldü.

3.18. Amilaz ve Proteaz Enzimleri Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi:

Enzim olarak NB besi yerinden elde edilen üst sıvı kullanıldı. Substrat olarak kullandığımız nişasta ve azokazein % 0,5 'lik olacak şekilde sırasıyla sitrik asit (0,1 M pH 4, 5 ve 6), Tris-HCl (0,1 M pH 7, 8, ve 9) ve karbonat/bikarbonat (0,1 M pH 10, 11) tamponları içerisinde ayrı ayrı hazırlandı.

Daha sonra bakterilerin her biri için optimum sıcaklıkta Bernfeld (1955) yöntemine göre α -amilaz aktivite tayini ve Leighton ve ark. (1973) göre proteaz enzimi aktivitesi ölçüldü.

3.19. Amilaz ve Proteaz Enzimleri Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi:

Enzim olarak; NB besi ortamında üretilen bakterilerin bulunduğu fermante sıvıların santrifüj edilmesiyle elde edilen üst sıvı kullanıldı. Daha sonra 30 °C'den 10 °C'lik artan sıcaklık aralıklarıyla 90 °C'ye kadar Bernfeld (1955) yöntemine göre α -amilaz aktivitesi ve Leighton ve ark. (1973) göre proteaz enzimi aktivitesi ölçüldü.

3.20. Protein Miktar Tayini (Lowry Yöntemi, 1951):

Öncelikle konsantrasyonunu bildiğimiz standart protein çözeltisi (1mg/ml BSA) hazırlandı. Bu standart çözülden faydalanarak konsantrasyonunu bilmediğimiz çözültideki protein miktarı Lowry yöntemine göre hesaplandı. Bunun için artan konsantrasyonlarda hazırlanan standart ve 50 μ l enzim çözeltisi alınarak tüplerin hepsine 5 ml alkalın çözeltisi eklendi ve 15 dk 40 °C'de bekletildikten sonra tüplerin hepsine 1:1 oranında seyreltilmiş 500 μ l FCR (Folin reaktifi) eklendi ve 30 dk. karanlıkta bekletildikten sonra 660 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldü.

Alkalın Çözeltisinin Hazırlanışı:

A; 0,1 N NaOH içinde %2 (w/v) Na₂CO₃ çözüldü.

B; %1 (w/v) Na-K-Tartarat içinde

% 5 (w/v) CuSO₄. 5H₂O çözüldü.

C;50 ml A belirteci ile 1 ml B belirteci karıştırılarak oluşturuldu.

3.21. Çöktürme ve Diyaliz:

Elde edilen izolatlardan 250 ml'lik erlenlere 50 ml sıvı NB besi yerine ekim yapılarak her izolat için optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyon sonunda besi yeri 10.000 rpm 'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı alınarak sırasıyla % 40, % 60, % 80'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Çöktürme sonrasında elde ettiğimiz sıvı hacmi ölçüldü ve 60 ml olarak belirlendi. İzolatlar 8600 rpm'de 30 dk santrifüj edildi ve pelet 1 nolu izolat (KP1) 0,1 M pH 8 Tris-HCl ve 3 nolu izolat için 0,1 M pH 7 Tris-HCl tamponu içerisinde çözülerek hacim 6 ml olarak belirlendi. Daha sonra % 20'lik etil alkolde 30 dk. kaynatılan ve saf su ile tekrar kaynatılarak temizlenen diyaliz hortumu içerisine çöktürme sonrası elde edilen sıvılar ayrı ayrı bırakıldı. Her bir izolat için uygun pH'da hazırlanan tamponlar içerisinde +4 °C'de 1 gece boyunca magnetik karıştırıcı üzerinde tuzdan arındırmak için inkübasyona bırakıldı. Diyaliz işlemi sonucunda sıvı hacim tek tek ölçüldü, 1 nolu ve 3 nolu izolat için sırasıyla 7 ml ve 5,5 ml olarak belirlendi. Elde edilen sıvı ependorflara bırakılarak -20 °C'de saklandı. Diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası Lowry yöntemine göre protein miktar tayini ve hem amilaz hem de proteaz enzimlerinin aktiviteleri ayrı ayrı ölçüldü.

3.22. Amilaz Enzimi ve Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisinin Araştırılması:

Amilaz ve proteaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine bazı kimyasalların etkisini belirlemek ve ortamdaki metal iyonlarını bertaraf etmek için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapıldı. Kullanılan kimyasalların (CaCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, MnCl₂, HgCl₂, EDTA, PMSF) 50 mM'lık stok çözeltilerinden toplam hacimde (300 µl) 1,5 mM konsantrasyonu olacak şekilde ve %1'lik SDS hazırlandı. Diyaliz işleminden sonra elde edilen sıvılardan 100 µl enzim ile 10 µl metal ve diğer kimyasal çözeltilerle 30 dk. bekletildi. Ayrıca amilaz ve proteaz enzimlerinin aktivite tayinini yaparken hazırlanan kontrollerin yanı sıra sadece kullanılan kimyasalların bulunduğu kontroller de hazırlandı ve daha sonra amilaz ve proteaz enzimleri için ayrı ayrı aktivite tayinleri yapıldı.

3.23. Elektroforez

3.23.1. Nondenatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Laemmli, 1977)

Çözeltiler:

% 30 akrilamid / % 0,8 bis akrilamid : 30 g akrilamid, 0,8 g bis akrilamid saf su ile 100 ml'ye tamamlandı, filtre edildi. Koyu renkli şişede 4 °C 'de saklandı.

1.5 M Tris.HCl pH 8,8: 54,45 g Tris-base 150 ml'ye tamamlandı, 1N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı, hacim saf su ile 300 ml 'ye tamamlandı, filtre edilerek 4 °C'de saklandı.

0.5 M Tris. HCl pH 6,8: 6 g Tris-base 60 ml saf suda çözüldü, 1N HCl ile pH 6,8'e getirildi, hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı, filtre edilerek 4 °C'de saklandı.

% 10'luk APS (amonyum per sülfat) : 0,1 g APS saf su ile 1 ml'ye tamamlandı. Taze olarak hazırlanmalıdır.

Elektroforez tamponu: 3 g Tris, 14,4 g glisin, 0.1 g SDS, 1000 ml saf su ilave edilerek hazırlandı ve 4 °C'de saklandı.

İz boya (örnek boya) : 7 ml 0,1M Tris. HCl pH 6.8 , 3,6 ml gliserol, 1,2 mg BFB ile 10 ml saf su ilave edildi. 1'er ml olacak şekilde, ependorflara konarak -70 °C'de saklandı.

% 10'luk SDS: 0,1 g SDS saf su ile 1 ml'ye tamamlandı.

% 3'lük nişasta: 0.3g nişasta 0,1 M Tris. HCl pH 8 ile 10 ml'ye tamamlandı.

İyot solüsyonu: 14 mM KI ve 10m M I₂ saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

3.23.2. Jelin Hazırlanması

Çalışmalarımızda % 7'lik jel kullanıldı. Ayırma jeli için, 3,5 ml akrilamid / bis akrilamid, 3,75 ml 0,1 M Tris. HCl (pH 8.8), 7,75 ml saf su, 75 µl % 10 'luk APS (Amonyum per sülfat), 7.5µl % 10'luk SDS, 10 µl TEMED ile nişastalı jel için 3,5 ml akrilamid / bis akrilamid, 3,75 ml 0,1 M Tris. HCl (pH 8.8), 7,75 ml saf su, 75 µl % 10 'luk APS (Amonyum per sülfat), 7.5µl % 10'luk SDS, 10 µl TEMED 660µl % 3'lük nişastalı ve nişastasız jelden oluşan iki ayrı ayırma jeli buz içerisinde ve sürekli magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazırlandı.

Konsantrasyon jeli için, 520µl akrilamid/bis akrilamid, 1 ml 0,1 M Tris. HCl (pH 6.8) , 20 µl % 10 'luk APS, 4µl TEMED, 4µl % 10'luk SDS ve 2.44 ml saf sudan oluşan karışım hazırlandı. İşlemler buz içerisinde ve karıştırılarak yapıldı.

İki cam levha arasına 6 cm yükseklikte ayırma jeli döküldü, üzerine pastör pipetiyle, su ile doyurulmuş izopropanol konarak hava ile teması kesildi. Oda ısısında 30-60 dakika polimerizasyon gerçekleşti. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra izopropanol distile su ile yıkandı. Kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi ve konsantrasyon jeli döküldü. Hava ile temasını kesmek için, üzerine izopropanol kondu. Oda sıcaklığında 30-45 dakika sonra polimerizasyon gözlemlendi.

3.23.3. Elektroforez İşlemi

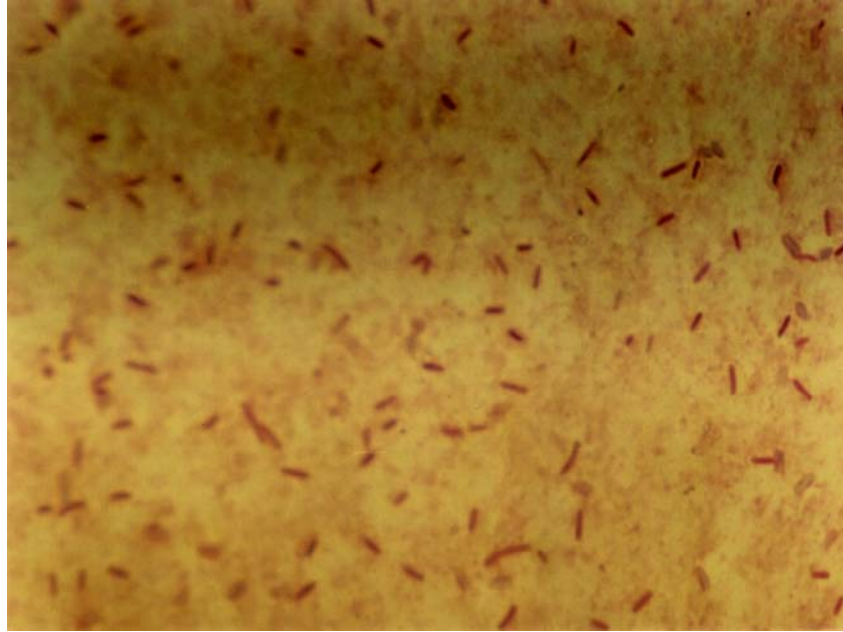
Standart protein olarak, β -Galaktosidaz'dan ve 10 μ l ticari alfa-amilaz (0,005 g/ml)'den 15 μ l alındı. Farklı ependorflar içerisine konulup üzerlerine 15'er μ l iz boya eklendi. Elektroforez yapılacağı zaman jelin üzerindeki su alındı. Numunelerin +4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakikalık santrifüjden sonra üst sıvıdaki enzim çözeltisinden (fermantasyon sonrası sıvılar 1F ve 3F) ve çöktürme ile diyaliz işlemlerinden sonra elde edilen sıvılardan (1D ve 3D) 1F için; 25 μ l, 1D için; 37,5 μ l, 3F için; 25 μ l, 3D için; 40 μ l numuneden alınarak her biri farklı ependorflara konularak üzerlerine 20 μ l iz boya, eklendi. Örnekler kuyucuklara sırasıyla konuldu. 1.00 mm'lik jele 250V (40 mA) akım verildi, yaklaşık 2 saat sonra elektroforez işlemi tamamlandı. Camlar arasındaki jel çıkarıldıktan sonra, 1 saat 0.1 M Tris. HCl (pH 8)'de bekletildi. Sonra tampon çözeltisi dökülüp nişastalı jel üzerine iyot solüsyonu eklenip yarım saat sonra incelemeye alındı (Laemmli, 1970; Matzka, 2000). Nişastasız jel üzerine Commasie Brilliant Blue'dan oluşan boya solüsyonu döküldü ve yarım saat bekletildikten sonra boya dökülerek üzerine boya çıkarma solüsyonu eklenip incelemeye alındı.

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon işlemi:

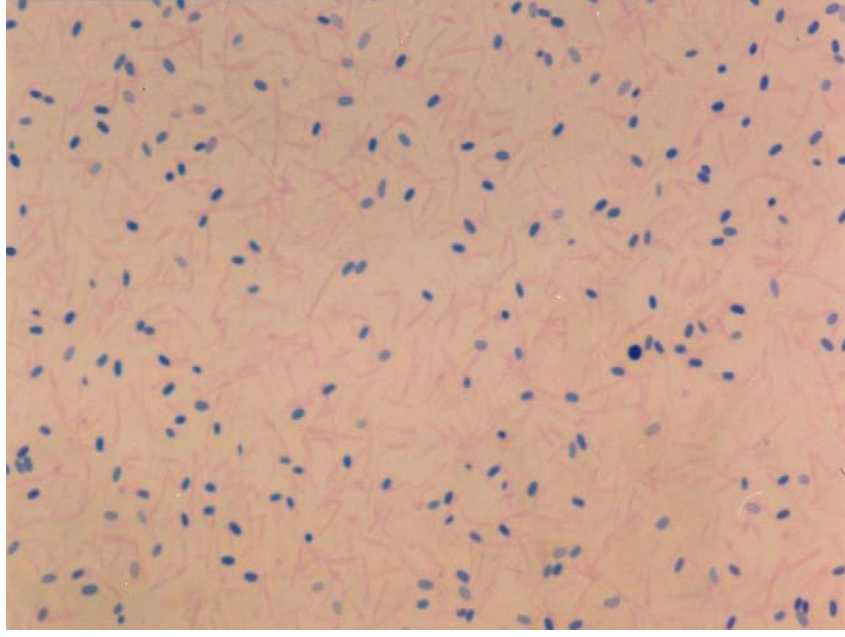
Diyadin ilçesi sıcak su kaynaklarından alınan su ve çamur örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. Çamur örnekleri 80° C’de 10 dk. bekletildikten sonra NB besi yerine ekim yapıldı ve elde edilen saf kültürlerden; Köprü Kaplıcası’ndan elde edilen izolat KP1, Dibekli Köyü sıcak su kaynağından elde edilen izolat DB2, Davutlu Çermiği’nden elde edilen izolat DV3 ve Kuşburnu Köyü’nden elde edilen izolat KB4 olarak isimlendirildi. Bu izolatlar içinde en iyi üreme ve aktivite gösteren iki izolat (KP1 ve DV3) seçilmiştir.

4.2. Bakterilerin Gram Boyama Özellikleri



Resim 5: KP1’in gram boyama özelliği

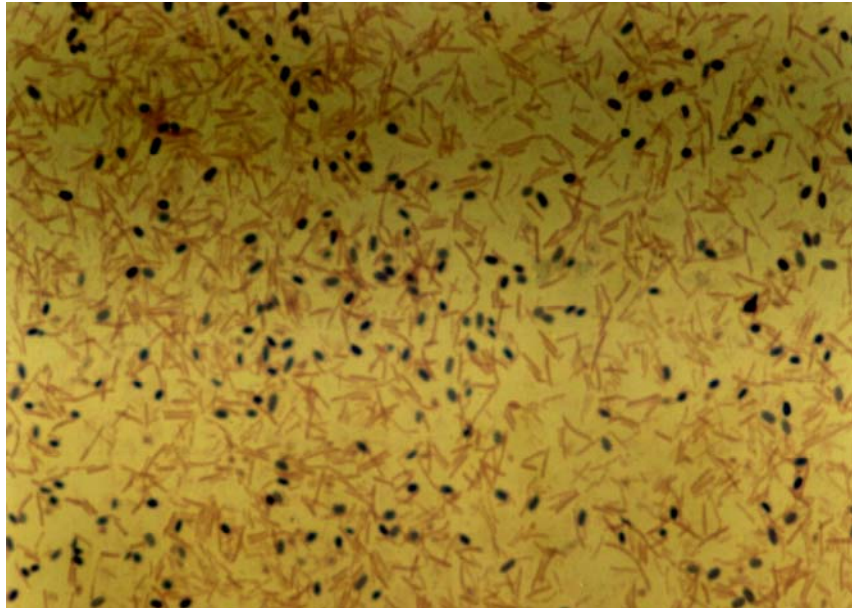
Resim 5’te görüldüğü üzere Köprü Kaplıcası’ndan elde edilen KP1’in Gram boyama işlemi gerçekleştirilmiş ve izolatın Gram pozitif, çubuk şeklinde olduğu belirlenmiştir.



Resim 6: DV3'ün gram boyama özelliği

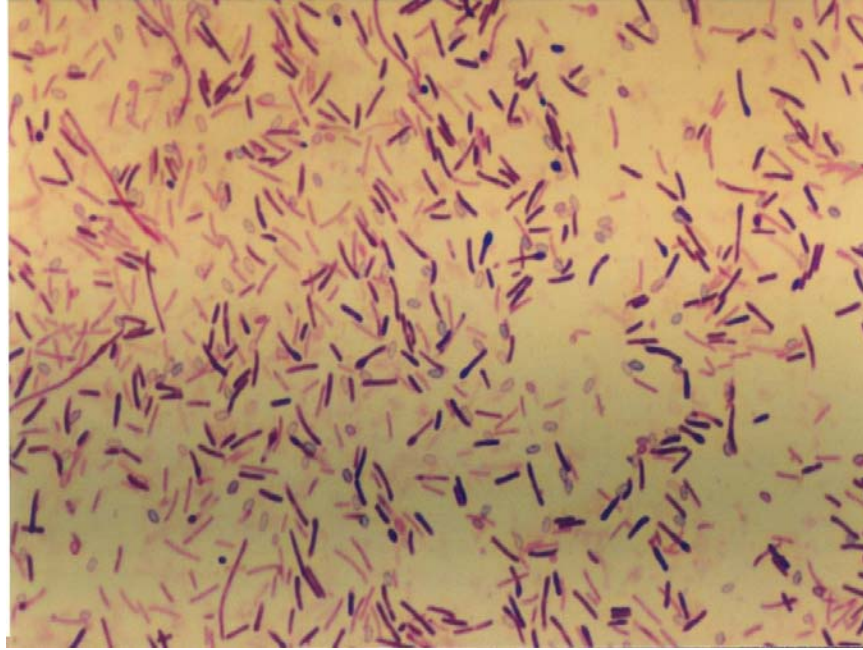
Resim 6'da görüldüğü üzere Davutlu Kaplıcası'ndan elde edilen DV3'ün Gram boyama işlemi gerçekleştirilmiş ve izolatın Gram pozitif, çubuk şeklinde olduğu belirlenmiştir.

4.3. Bakterilerin Spor Boyama Özellikleri



Resim 7: KP1'in spor boyama özelliği

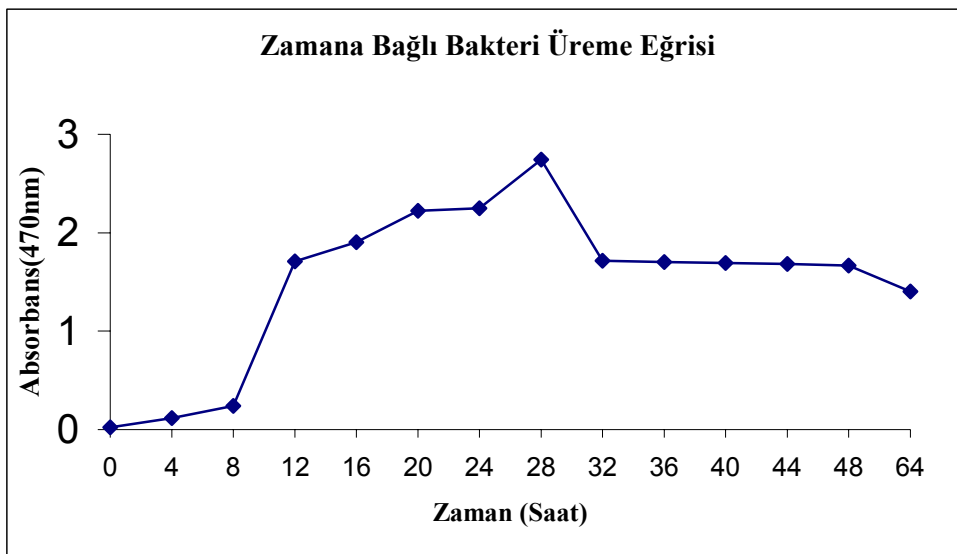
Resim 7’de görüldüğü üzere Köprü Kaplıcası’ndan elde edilen KP1’in spor boyama işlemi gerçekleştirilmiş ve oval şekilde spor oluşturduğu gözlenmiştir.



Resim 8: DV3’ün spor boyama özelliği

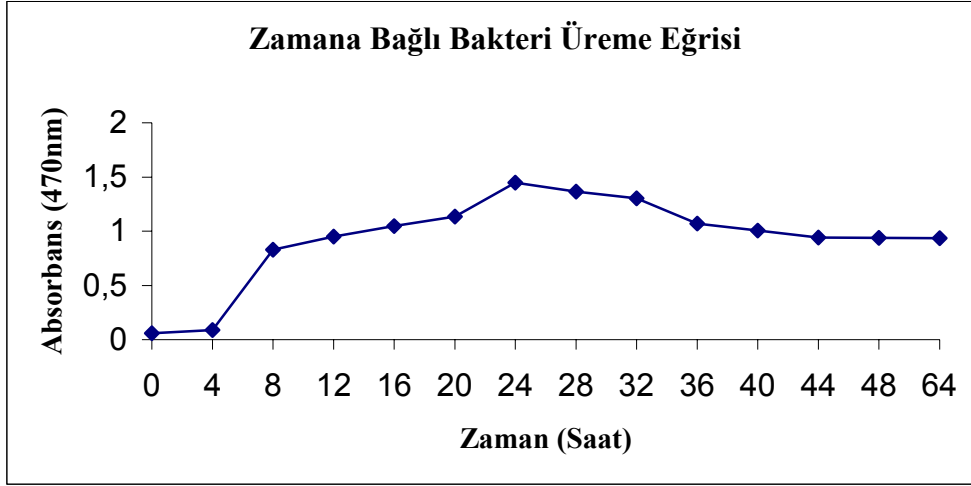
Resim 8’de görüldüğü üzere Davut Kaplıcası’ndan elde edilen DV3’ün spor boyama işlemi gerçekleştirilmiş ve spor oluşturduğu gözlenmiştir. Sporların oval ve terminal konumlu olduğu gözlenmiştir.

4.4. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması:



Şekil 5: İnkübasyon Süresinin KP1’in Üremesi Üzerine Etkisi

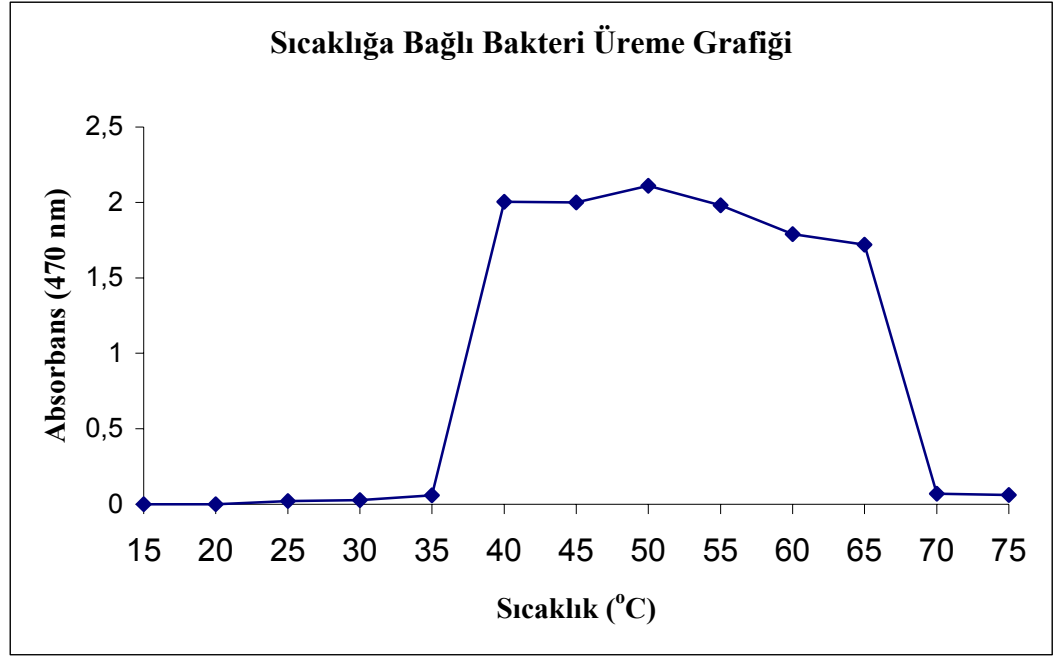
Sıcak su kaynaklarında izole edilen KP1'in değişik inkübasyon sürelerinde uygun besi ortamında (NB) ve 50 °C'de üretimleri yapılmıştır. Şekil 5'te görüldüğü gibi 8. saatten itibaren bakteri üremesinde artış meydana gelmiş ve 28. saatte maksimum değere ulaşmış, 32. saatten sonra azalan bir eğilim göstermektedir. Bu yüzden ve KP1'in üreme ve gelişmesi için uygun inkübasyon süresi 28 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 6: Inkübasyon Süresinin DV3'ün Üremesi Üzerine Etkisi

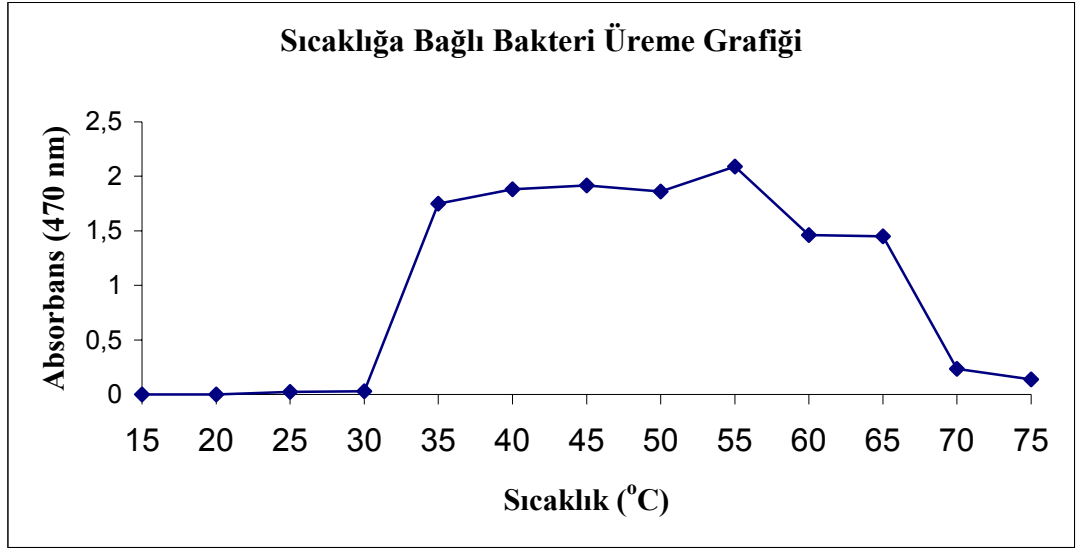
Sıcak su kaynaklarında izole edilen DV3'ün değişik inkübasyon sürelerinde uygun besi ortamında (NB) ve 50 °C'de üretimleri yapılmıştır. Şekil 6'da görüldüğü gibi 4. saatten itibaren bakteri üremesinde artış meydana gelmiş, 24. saatte maksimum değere ulaşmış ve 24. saatten sonra azalan bir eğilim göstermektedir. Bu yüzden DV3'ün üreme ve gelişmesi için uygun inkübasyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir.

4.5. Sıcaklığın Mikroorganizmaların Üremesi Üzerine Etkisi:



Şekil 7: Sıcaklığın KP 1'in Üremesi Üzerine Etkisi

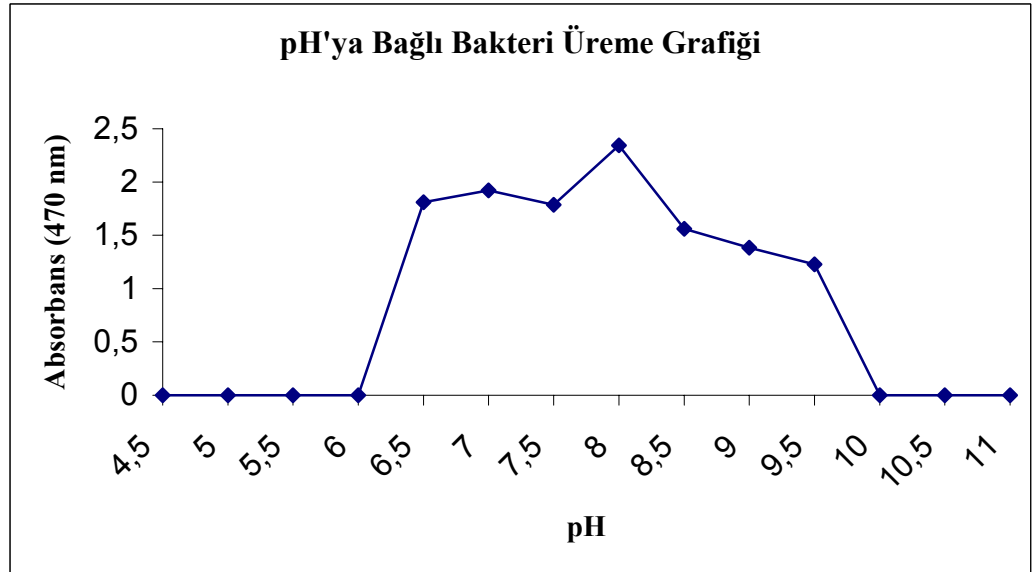
Sıcak su kaynaklarında izole edilen KP1'in değişik sıcaklık değerlerinde üreme potansiyelini belirlemek için; 5°C'lik artışla 15 °C'den 75 °C'ye kadar inkübasyon sürelerinde uygun besi ortamında (NB) optimum üreme zamanı olan 28 saat inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 7'de görüldüğü gibi 35 °C'den sonra hızlı bir üreme artışı gözlenmektedir. Ayrıca 40 °C'den 65 °C'ye kadar üreme potansiyeline sahip olduğu ve 50 °C'den sonra bakterinin üremesinde azalma görülmektedir. Bu izolat için optimum üreme sıcaklığı 50 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 8: Sıcaklığın DV3'ün Üremesi Üzerine Etkisi

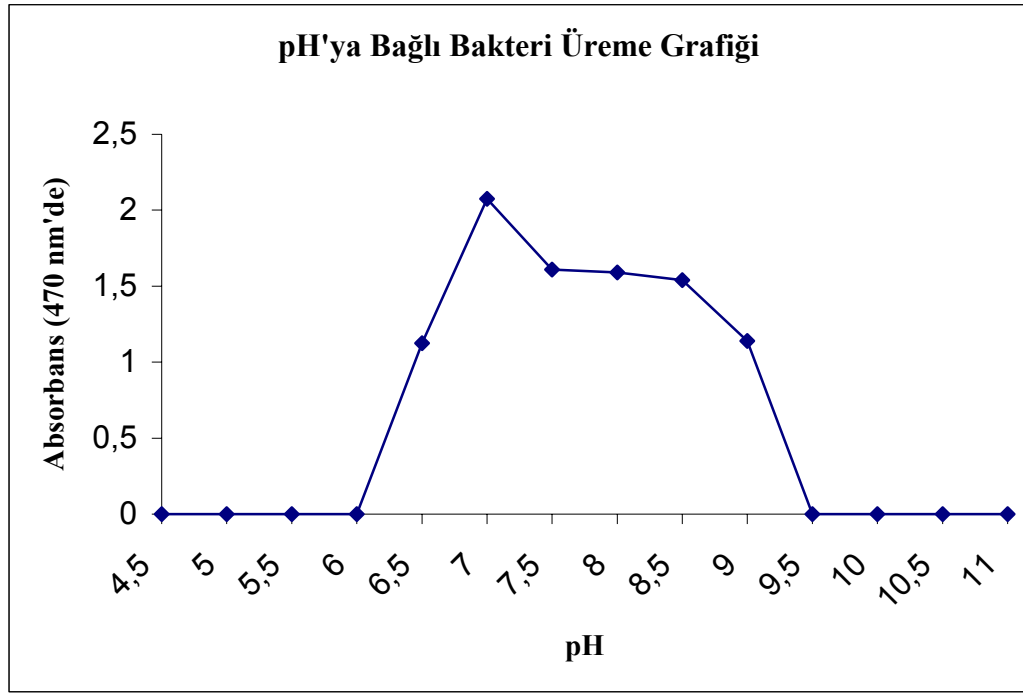
Sıcak su kaynaklarında izole edilen DV3'ün değişik sıcaklık değerlerinde üreme potansiyelini belirlemek için; 5°C'lik artışla 15 °C'den 75 °C'ye kadar uygun besi ortamında (NB) optimum üreme zamanı olan 24 saat kadar inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 8'de görüldüğü gibi 30 °C'den sonra hızlı bir üreme artışı gözlenmektedir. Ayrıca 35 °C'den 70 °C'ye kadar üreme potansiyeline sahip olduğu ve 55 °C'den sonra bakterinin üremesinde azalma görülmektedir. Bu izolat için optimum üreme sıcaklığı 55 °C olarak belirlenmiştir.

4.6. pH'nın Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisi:



Şekil 9: pH'nın KP 1'in Üremesi Üzerine Etkisi

Sıcak su kaynaklarında izole edilen KP1'in değişik pH değerlerinde üreme potansiyelini belirlemek için; 5 birimlik artışla pH 4,5'ten pH 11'e kadar 50 °C'de uygun besi ortamında (NB) optimum üreme zamanı olan 28 saat inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 9'da görüldüğü gibi pH 6'dan sonra hızlı bir üreme artışı gözlenmektedir. Ayrıca pH 6,5'den pH 9,5'e kadar üreme potansiyeline sahip olduğu ve pH 10'dan itibaren üreme göstermediği, pH 8'den sonra bakterinin üremesinde azalma görülmektedir. Bu izolat için optimum üreme pH'sı 8 olarak belirlenmiştir.



Şekil 10: pH'nın DV3'ün Üremesi Üzerine Etkisi

Sıcak su kaynaklarından izole edilen DV3'ün değişik pH değerlerinde üreme potansiyelini belirlemek için; 5 birimlik artışla pH 4,5'ten pH 11'e kadar 55 °C'de uygun besi ortamında (NB) optimum üreme zamanı olan 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 10'da görüldüğü gibi pH 6'dan sonra hızlı bir üreme artışı gözlenmektedir. Ayrıca pH 6,5 'ten pH 9,5'a kadar üreme potansiyeline sahip olduğu, pH 9,5'tan itibaren üreme göstermediği ve pH 7'den sonra bakterinin üremesinde azalma görülmektedir. Bu izolat için optimum üreme pH'sı 7 olarak belirlenmiştir.

4.7. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler :

Tablo 4: KP1 ve DV3'ün Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

	KP1	DV3
Gram Özelliği	+	+
Sporlar Oluşturma	+ (oval)	+ (oval, terminal)
Hareket Özelliği	+	-
Aerobik Büyüme	+	+
Büyüme Sıcaklığı	40 °C-65 °C (optimum 50 °C)	35 °C -70 °C (optimum 55 °C)
Büyüme pH'sı	6,5 -9,5(optimum 8)	6,5-9,0(optimum 7)
Katalaz Aktivitesi	+	+
Kazein Hidrolizi	+	+
Nişasta Hidrolizi	+	+
Jelatin Hidrolizi	-	-
Üreaz Aktivitesi	+	+
Lipaz Aktivitesi	+	+
Penisilin Antibiyotiğine Karşı Özelliği	S	S

+ : Pozitif özellik gösterme

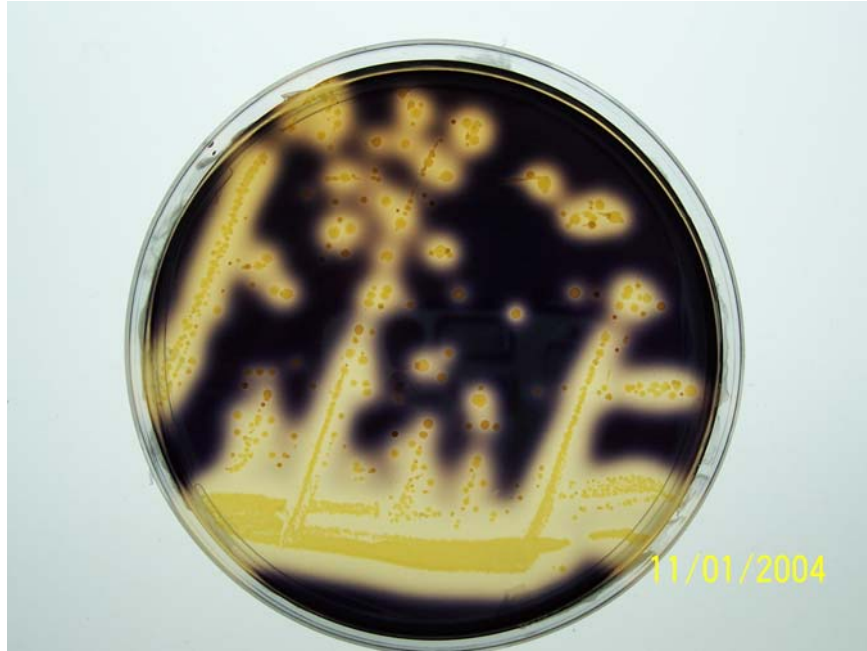
- : Negatif özellik gösterme

S : Antibiyotiğe karşı duyarlı

4.7.1. Nişasta Hidrolizi Testi:



Resim 9: KP1'in Nişasta Hidrolizi Testi



Resim 10: DV3'ün Nişasta Hidrolizi Testi

KP1 ve DV3 tarafından sentezlenen ekstraselüler amilaz enziminin nişastayı parçalayıp parçalamadığını ortaya koymak amacıyla nişastalı besi yerine bu izolatlardan ekim yapılmış ve inkübasyon sonucunda petri üzerine iyodür solüsyonu damlatılmıştır ve Resim 9 ve Resim 10’da görüldüğü gibi tüm besi ortamının iyodürle koyu menekşe rengine boyandığı ancak, kolonilerin etrafında açık renkli zonlar oluştuğu gözlemlendi. Açık renkli olan bu bölgeler nişastanın α -amilaz enzimi tarafından parçalandığını göstermektedir.

4.7.2. Jelatin Hidroliz Testi:

KP1 ve DV3 tarafından sentezlenen jelatini hidrolizleyen jelatinaz enzimi sentezleyip sentezleyemediklerini ölçmek için % 10 jelatin içeren besiyeri hazırlandı ve saf ve taze mikroorganizma kültürlerinden ekim yapıp inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda kontrollerle birlikte buz dolabında 1-2 saat bırakıldı. Erimenin olup olmadığı gözlemlendi ve KP1 ve DV3’ün bulunduğu ortamda jelatin hidrolizi olmadığı gözlemlendi.

4.7.3. Katalaz Testi:



Resim 11: KP1’in Katalaz Testi



Resim 12: DV3'ün Katalaz Testi

KP1 ve DV3 izolatları NB besi yerine ekim yapıldı. Katalaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini saptamak amacıyla taze haldeki (18-24 saatlik) mikroorganizma kültürleri üzerine yavaş yavaş % 3'lük taze hazırlanmış hidrojen peroksit ilave edildi ve inceleme yapıldı. Resim 11 ve Resim 12'de görüldüğü gibi hidrojen peroksit ilavesinden sonra kolonilerin bulunduğu yerlerde kabarcıklar görülmektedir, bu da katalaz enziminin sentezlendiğini göstermektedir.

4.7.4. Kazein Hidroliz Testi:

Süt proteinini oluşturan kazeinin proteaz enzimi vasıtasıyla hidrolizlenip hidrolizlenmediklerini tespit etmek amacıyla; % 10 skim milk bulunan besi yeri hazırlandı ve taze kültür ekilerek bir gün süreyle optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kolonilerin etrafında şeffaf zonların oluşup oluşmadığına bakıldı. Oluşan zonları daha iyi tespit edebilmek için % 1'lik HCl damlatılarak inceleme yapıldı. Resim 13'de görüldüğü gibi KP1'in oluşturduğu kolonilerin etrafında şeffaf zonlar görülmektedir, bu zonlar proteaz tarafından kazeinin parçalandığını göstermektedir. Aynı durum DV3 için de görülmüştür.



Resim 13: KP1'in Kazein Hidrolizi Testi

4.7.5. Üreaz Testi:

Üreyi hidroliz eden üreaz enzimini KP1 ve DV3'ün sentezleyip sentezleyemediklerini tespit etmek için üre agarlı besi yeri tüplerde hazırlandı. Taze kültüre edilmiş mikroorganizmalar besi yerine ekim yapıldı ve 2-5 gün süreyle mikroorganizmaların optimum sıcaklık derecesinde inkübasyona bırakıldı. Resim 14 ve Resim 15'te görüldüğü gibi açık sarı renkli kontrolle karşılaştırıldığında KP 1'in ve DV3'ün bulunduğu tüplerde turuncu renk değişimi olmuştur. Bu renk değişimi izolatların her ikisinin de üreyi üreaz enzimi tarafından parçaladığını göstermektedir.

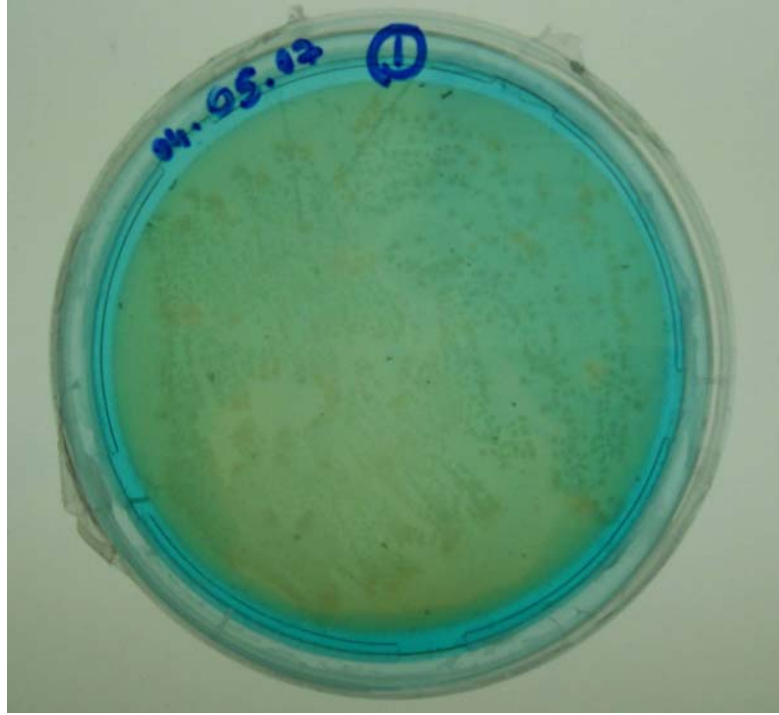


Resim 14: KP1'in Üreaz Testi



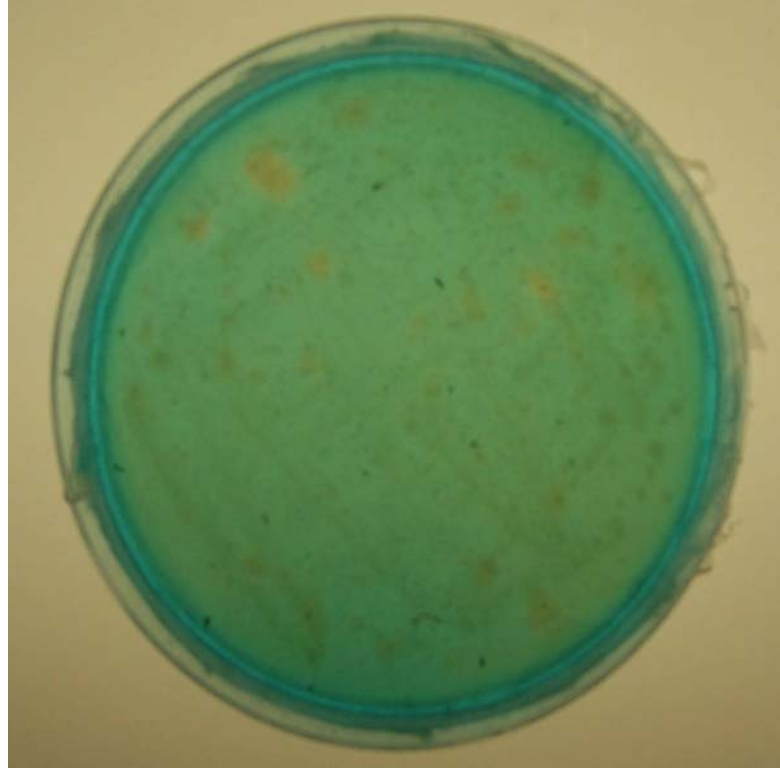
Resim 15: DV3'ün Üreaz Testi

4.7.6. Lipaz Testi:



Resim 16: KP1'in Lipaz Testi

KP1 ve DV3 izolatlarının yağları parçalayan lipaz enzimini sentezleyip sentezleyemediklerini tespit etmek için; 0,75 gr et özütü, 1,25 gr pepton, 3,79 gr agar ve 2,5 gr tereyağı içeren besi ortamına her bir izolatın taze kültürlerinden ayrı ayrı ekim yapılarak her biri için optimum sıcaklıkta 1 gün süreyle inkübasyona bırakıldı ve ertesi gün oluşan kolonilerin bulunduğu petri kabına aşırı doymuş CuSO_4 çözeltisi damlatıldı. Resim 16 ve Resim 17'de görüldüğü gibi izolatların oluşturduğu kolonilerin etrafında mat yeşilimsi sahalar meydana gelmiştir, bu da lipaz sentezlenerek besi ortamında bulunan yağların parçalandığını gösterir.



Resim 17: DV3'ün Lipaz Testi

4.7.7. Hareket Testi:

KP1 ve DV3 izolatlarının hareket yeteneklerinin olup olmadığını belirlemek için; % 0,4-0,5'lik berrak yarı katı agarlı besiyeri buyyon tüplerin içinde kapiler tüplerin bulunduğu besi ortamına döküldü ve izolatların gecelik taze kültürlerinden ekim yapıldı ve inkübasyona bırakıldı. Resim 18'de görüldüğü gibi izolat 1 kontrolle karşılaştırıldığında inokülasyon hattı boyunca üremenin olduğu ve inokülasyon hattından agarın içine doğru bir yayılma gözlenmektedir. Bu nedenle izolat 1'in hareketli olduğunu göstermektedir.



Resim 18: KP1'in Hareket Testi

Aynı işlem DV3 için de yapılmıştır ve Resim 19'da görüldüğü gibi inokülasyon hattı boyunca üreme olduğu, ancak sağa sola doğru yayılma ve dallanma olmadığından bu izolatın hareketsiz olduğu tespit edilmiştir

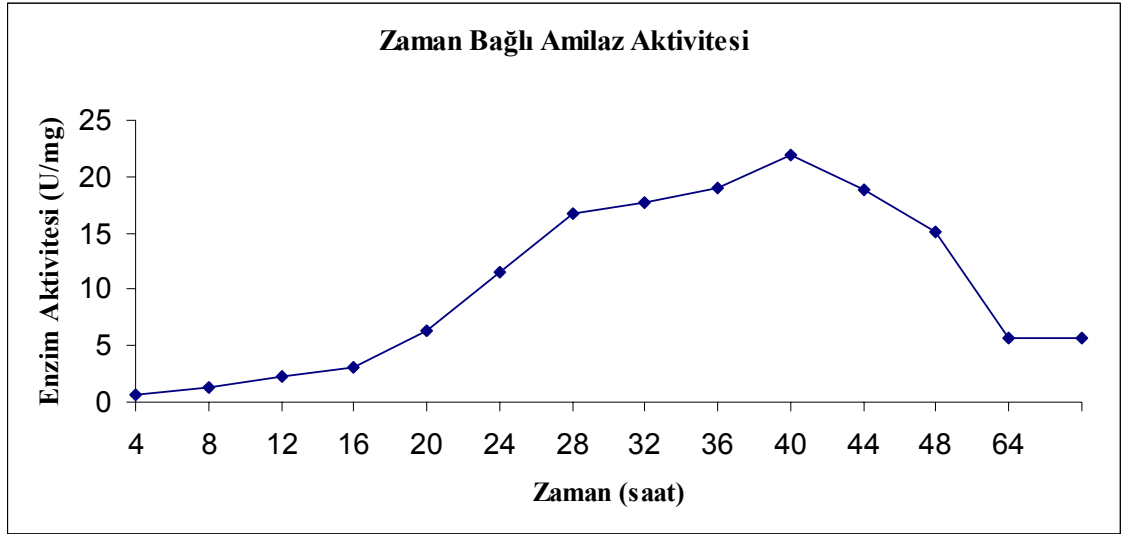


Resim 19: DV3'in Hareket Testi

4.7.8. Antibiyotiklere Karşı Duyarlılık Testi

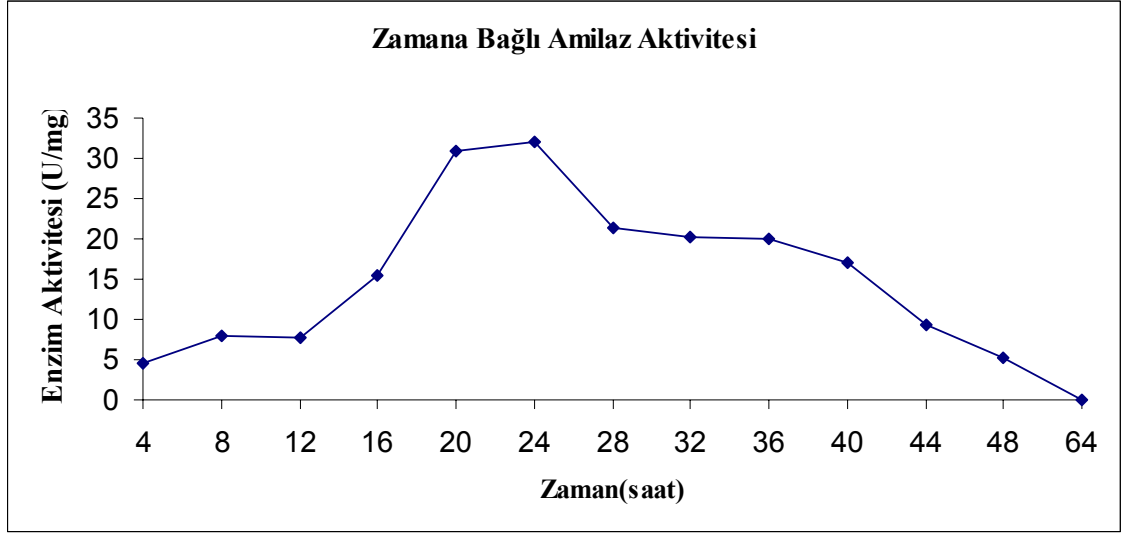
İzolatların üreyebilmesi için uygun besi ortamına (NB) bakterilerin taze kültürlerinden yayma ekim yapıldı ve 6 mm kağıt disklerden oluşan Amoxycilin Clawlanic Asid (AMC) 30 µg, Netilmicin (NET) 30 µg, Ofloxacin (OFX) 5 µg, Imipenem (IPM) 10 µg antibiyotiklerinin bulunduğu diskler ekim yapılan yüzeye bırakıldı ve izolatlar için belirlenen optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda antibiyotik disklerin etrafında zon oluşup oluşmadığı gözlemlendi. İzolat 1 için antibiyotik testi ile ilgili yapılan gözlemlerde NET ve OFX antibiyotiklerine de karşı duyarlı olduğu ve zon büyüklüğü 30 mm olduğu, AMC ve IPM antibiyotiklerine duyarlı olduğu ve zon büyüklüğünün >30 mm olduğu belirlendi. İzolat 3 için antibiyotik testi ile ilgili yapılan gözlemlerde OFX antibiyotiğine karşı duyarlı olduğu ve zon büyüklüğünün 30 mm olduğu, NET, AMC ve IPM antibiyotiklerine de duyarlı olduğu ve zon büyüklüğünün >30 mm olduğu belirlendi.

4.8. Değişik İnkübasyon Sürelerinde Amilaz ve Proteaz Enzimlerinin Aktivitesi



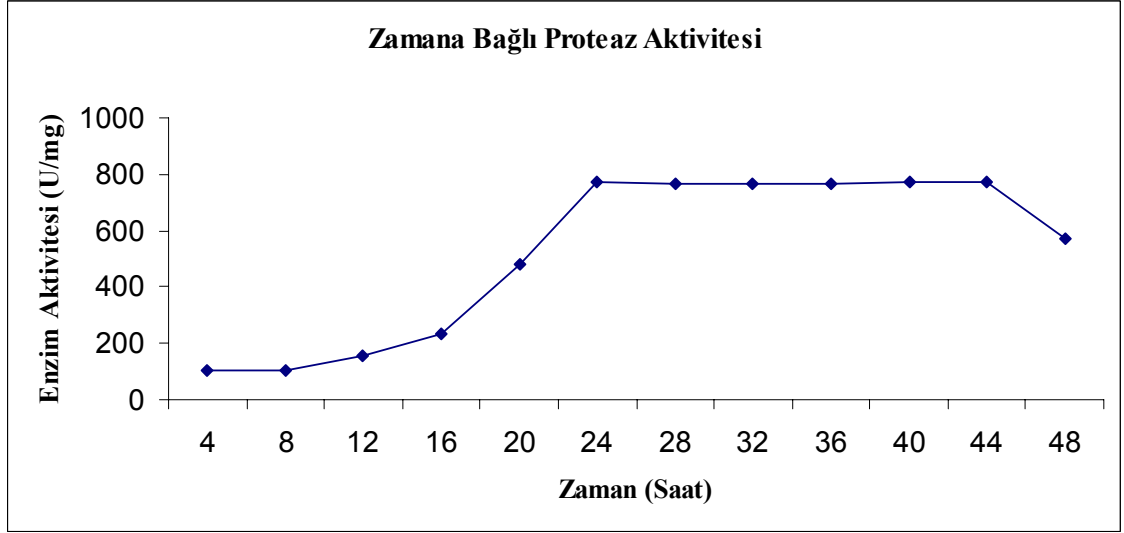
Şekil 11: KP1'in Değişik İnkübasyon Sürelerine Bağlı Amilaz Aktivitesi

NB besiyerinde KP1 50 °C'de üretilerek her 4 saatte bir besi yeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı (supernatant)'da değişik inkübasyon sürelerinde α-amilaz aktivite tayini yapıldı. Şekil 11'de görüldüğü gibi 40. saate kadar hızlı bir enzim aktivite artışı ve daha sonra 64. saate kadar enzim aktivitesinde bir azalma eğilimi görülmektedir. Maksimum enzim aktivitesi 40. saatte elde edilmiştir (21,96 U/mg).



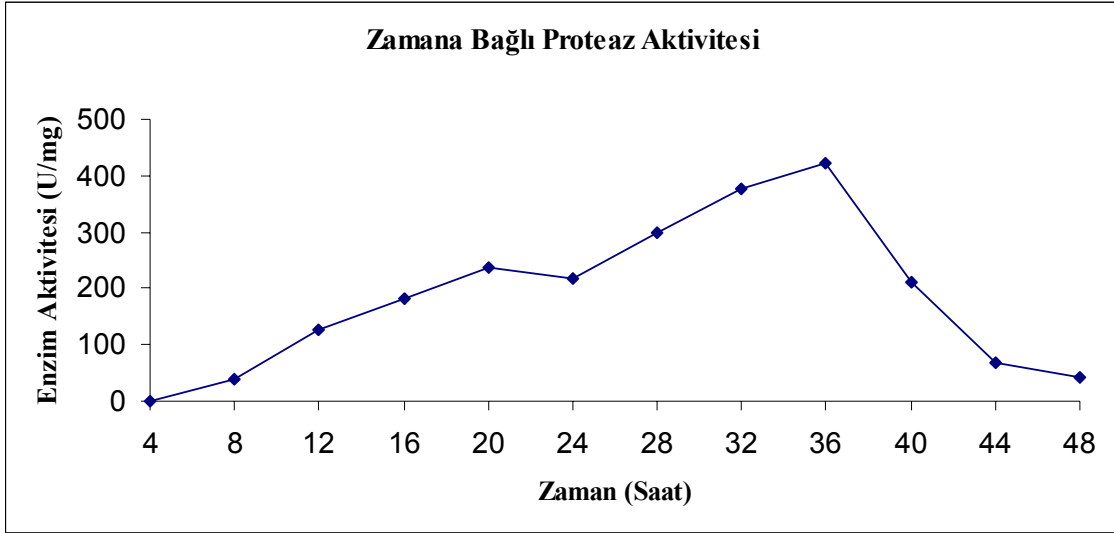
Şekil 12: DV3'ün Değişik İnkübasyon Sürelerine Bağlı Amilaz Aktivitesi

NB besiyerinde 55°C'de DV3 üretilerek her 4 saatte bir besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı (supernatant)'da değişik inkübasyon sürelerinde α -amilaz aktivite tayini yapıldı. Şekil 12'de görüldüğü gibi 20. saate kadar hızlı bir enzim aktivite artışı ve 24. saatten sonra 64. saate doğru gittikçe azalan bir eğilim göstermektedir. Maksimum enzim aktivitesi 24. saatte elde edilmiştir (32 U/mg).



Şekil 13: KP1'in Değişik İnkübasyon Sürelerine Bağlı Proteaz Aktivitesi

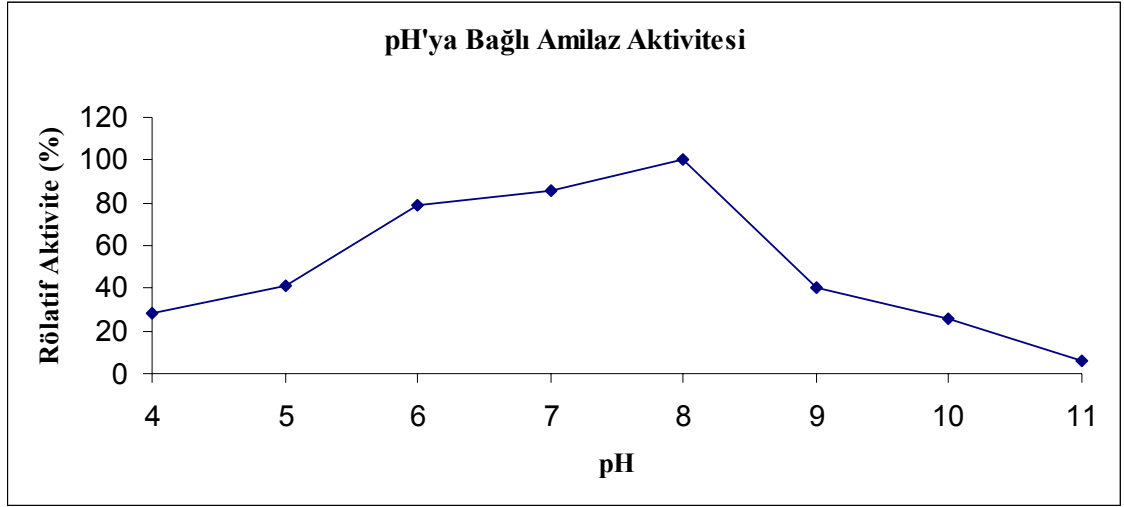
KP1, NB besi ortamında 50°C’de üretilerek her 4 saatte bir besiyeri 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı (supernatant)’da değişik inkübasyon sürelerinde proteaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 13’te 24. saatte hızlı bir enzim aktivite artışı ve 24.- 48. saatler arasında enzim aktivasyonunda değişim olmadığı, 48. saatten sonra gittikçe azalan bir aktivite görülmektedir. Maksimum enzim aktivitesi 24. saatte elde edilmiştir (771 U/mg).



Şekil 14: DV3’ün Değişik İnkübasyon Sürelerine Bağlı Proteaz Aktivitesi

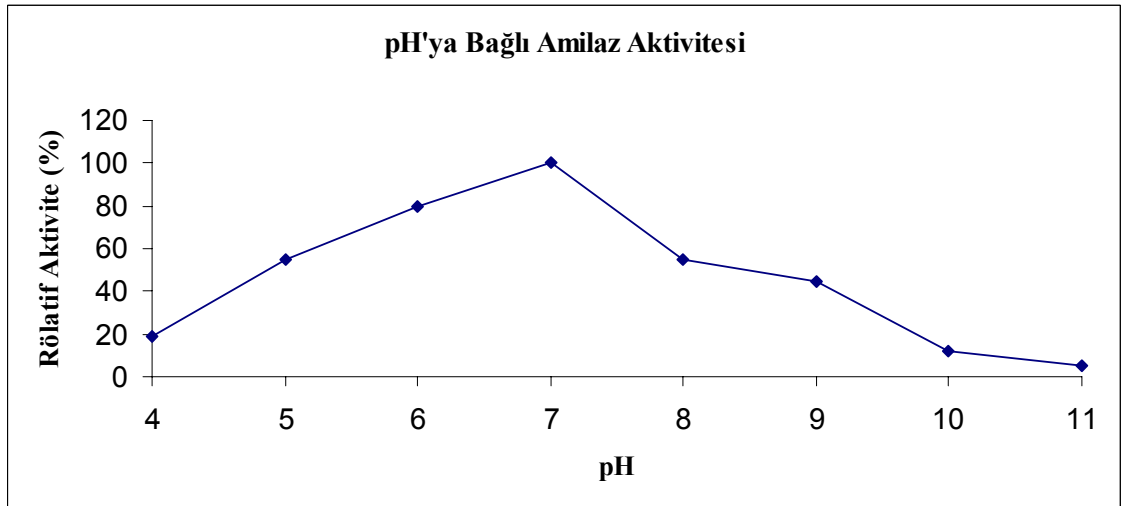
NB besiyerinde 55°C’de DV3 üretilerek her 4 saatte bir besiyeri 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı (supernatant)’da değişik inkübasyon sürelerinde proteaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 14’te 36. saate kadar hızlı bir enzim aktivite artışı ve 36. saatten sonra 48. saate doğru gittikçe azalan bir aktivite görülmektedir. Maksimum enzim aktivitesi 36. saatte elde edilmiştir (421 U/mg).

4.9. Amilaz ve Proteaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi:



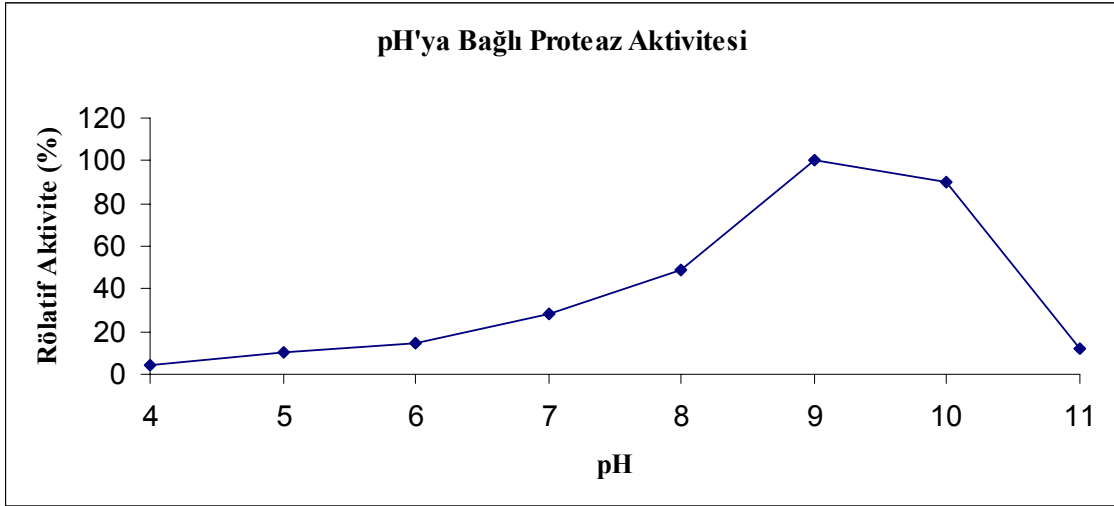
Şekil 15: KP1'in pH'ya Bağlı Amilaz Aktivitesi

KP1, NB besi ortamında 50 °C'de 24 saat üretilerek besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı (supernatant)'da pH 4 – 11 arasında α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 15'te pH 4'ten itibaren enzim aktivite artışı ve pH 8'dan sonra gittikçe azalan bir aktivite eğilimi görülmektedir. Optimum pH değeri 8 olarak tespit edilmiştir.



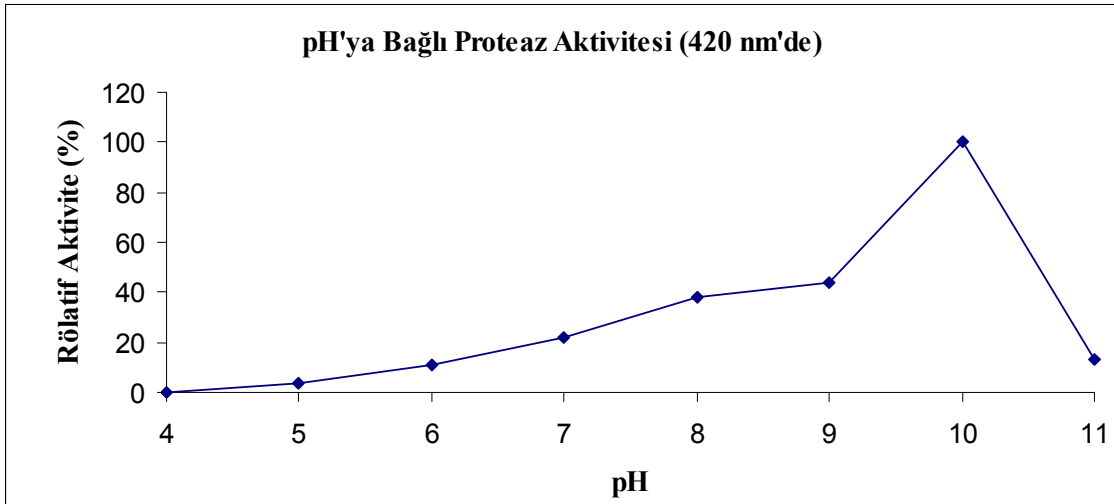
Şekil 16: DV3'ün pH'ya Bağlı Amilaz Aktivitesi

DV3, NB besi ortamında 55 °C'de 24 saat üretilerek besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı (supernatant)'da pH 4 – 11 arasında α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 16'da görüldüğü gibi pH 4'ten itibaren enzim aktivite artışı ve pH 7'dan sonra gittikçe azalan bir aktivite eğilimi göstermektedir. Optimum pH, 7 olarak bulunmuştur.



Şekil 17: KP1'in pH'ya Bağlı Proteaz Aktivitesi

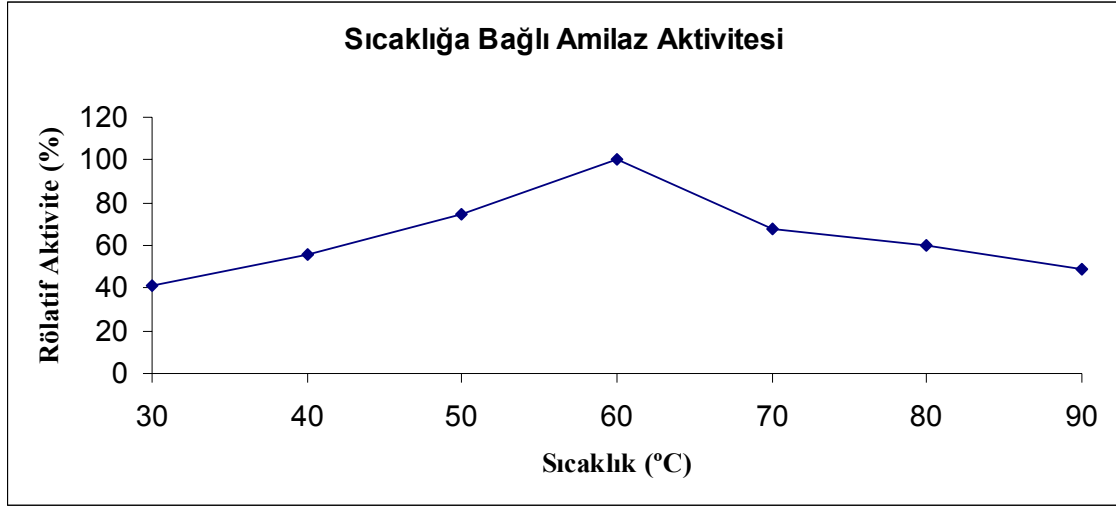
KP1, NB besi ortamında 50°C'de 24 saat üretilerek besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı (supernatant)'da pH 4 – 11 arasında proteaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 17'de pH 9'a kadar enzim aktivite artışı ve pH 9'dan sonra gittikçe azalan bir aktivite eğilimi görülmektedir. Optimum pH, 9 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 18: DV3'ün pH'ya Bağlı Proteaz Aktivitesi

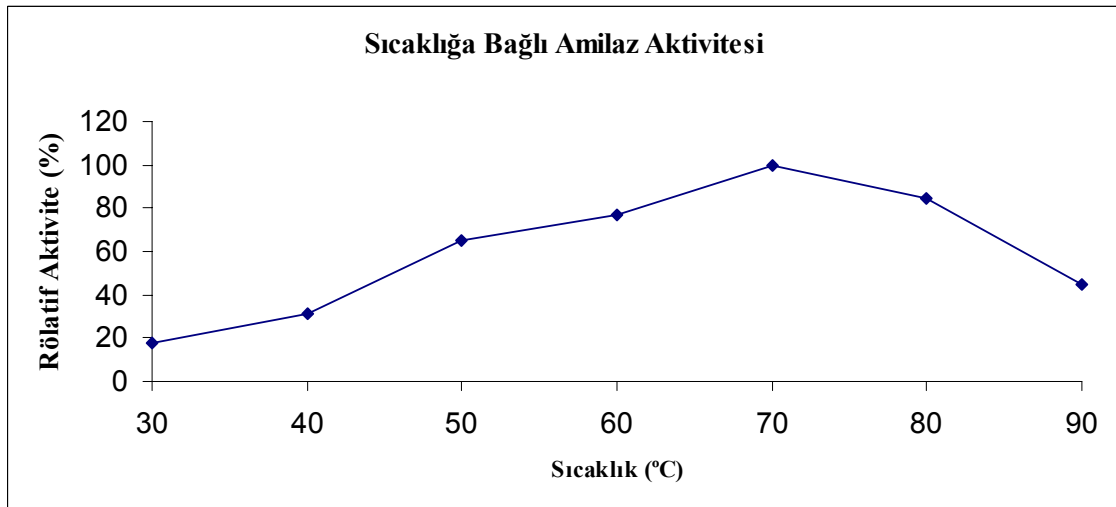
DV3, NB besi ortamında 55°C’de 36 saat üretilerek besiyeri 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı (supernatant)’da pH 4 – 11 arasında α -amilaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 18’de pH 5’ten itibaren enzim aktivite artışı, pH 9-10 arası hızlı bir aktivite artışı ve daha sonra gittikçe azalan bir aktivite eğilimi görülmektedir. Optimum pH, 10 olarak tespit edilmiştir.

4.10. Amilaz ve Proteaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi:



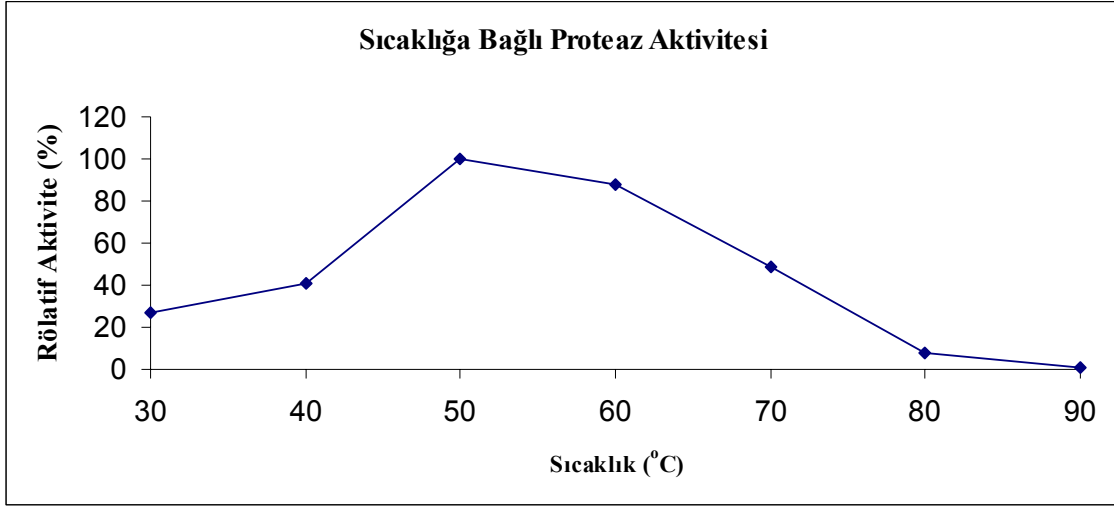
Şekil 19: KP1'in Sıcaklığa Bağlı Amilaz Aktivitesi

NB besiyerinde KP1 üretilerek 24. saatte besiyeri 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı 30 °C ile 90 °C arasında, pH 8’da hazırlanan substratlarla α -amilaz aktivite testi yapıldı. Şekil 19’da enzimin 60°C’de optimum aktivitesi görülmektedir.



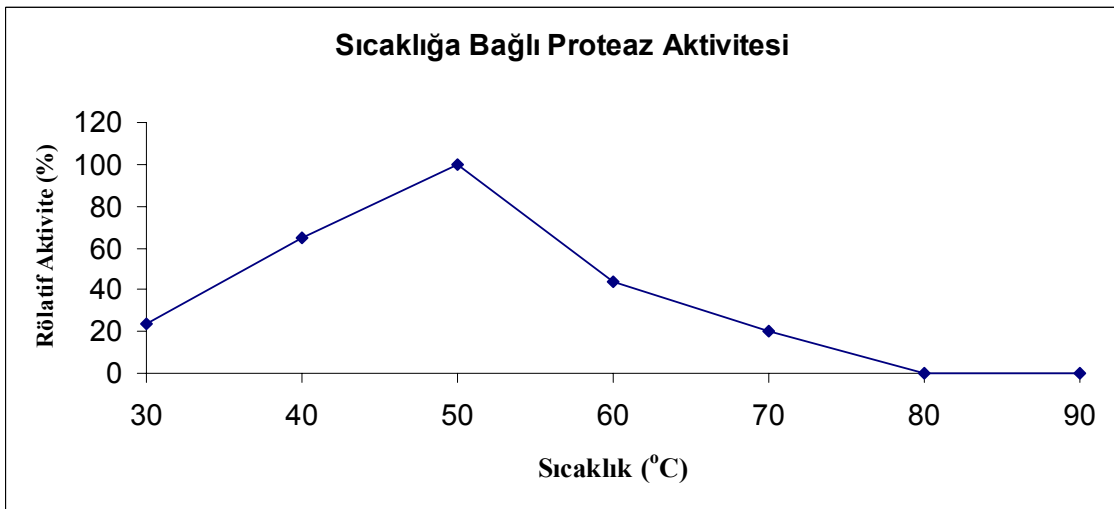
Şekil 20: DV3'ün Sıcaklığa Bağlı Amilaz Aktivitesi

NB besiyerinde DV3 üretilerek 24. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvıda 30 °C ile 90 °C arasında, pH 7'da hazırlanan substratlarla α -amilaz aktivite testi yapıldı. Şekil 20'de enzimin 70 °C'de optimum aktivitesi görülmektedir.



Şekil 21: KP1'in Sıcaklığa Bağlı Proteaz Aktivitesi

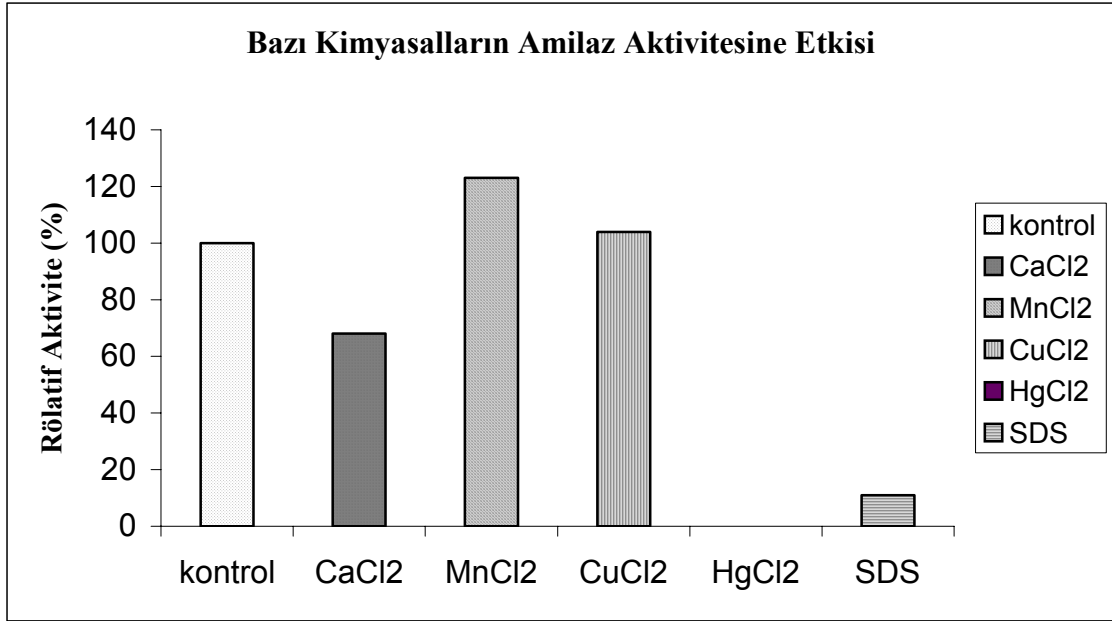
NB besiyerinde KP1 üretilerek 24. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvıda 30 °C ile 90 °C arasında, pH 9'da hazırlanan substratlarla proteaz aktivite testi yapıldı. Şekil 21'de enzimin 50 °C'de optimum aktivitesi görülmektedir.



Şekil 22: DV3'ün Sıcaklığa Bağlı Proteaz Aktivitesi

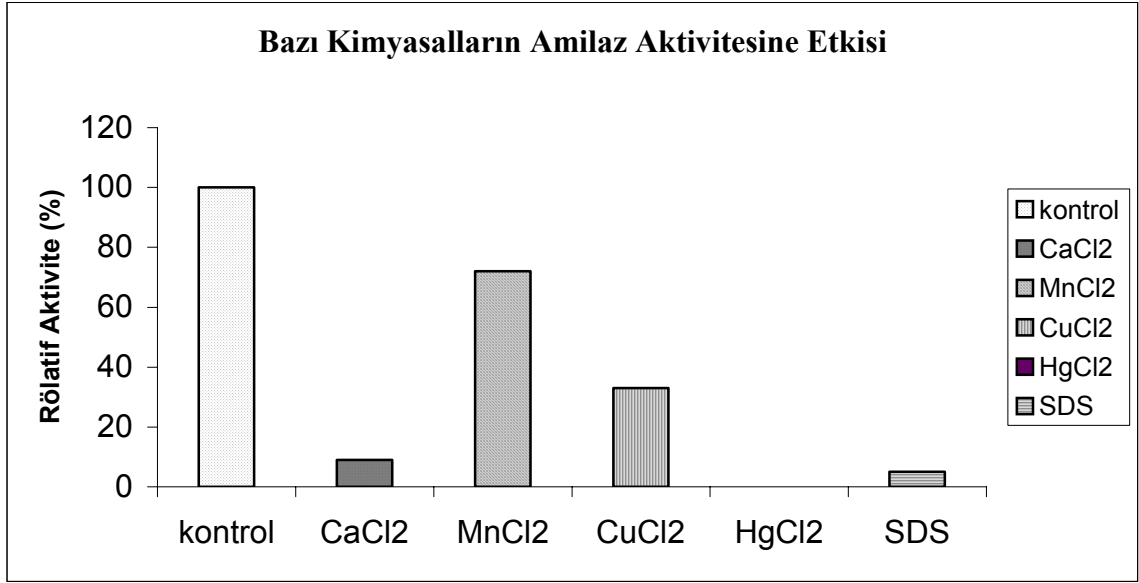
NB besiyerinde DV3 üretilerek 36. saatte besiyeri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvıda 30 °C ile 90 °C arasında, pH 10'da hazırlanan subsratlarla proteaz aktivite testi yapıldı. Şekil 22'de enzimin 50 °C'de optimum aktivitesi görülmektedir.

4.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi:

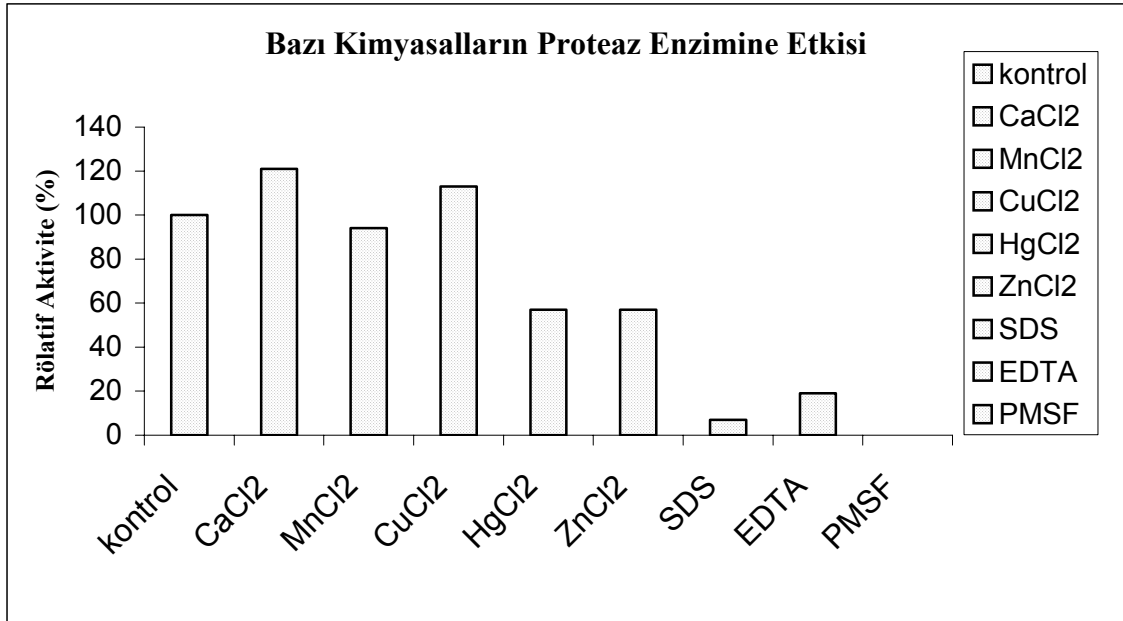


Şekil 23: Bazı Kimyasalların KP 1'den Elde Edilen Amilaz Aktivitesine Etkisi

Amilaz enziminin aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisini belirlemek için 50 mM'lık CaCl₂, CuCl₂, MnCl₂, HgCl₂ stok çözeltileri ve %1'lik SDS hazırlandı ve enzim aktivite tayininde kullanılan toplam hacimde (300 µl) 1,5 mM konsantrasyonunda olacak şekilde kullanıldılar. İzolatlar NB besiyerinde optimum sıcaklık, pH ve inkübasyon süresinde üretildi. Elde edilen fermente sıvı santrifüj edilerek üst sıvıları enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulduktan sonra elde edilen sıvı, yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan kimyasallarla etkileştirildi ve aktiviteleri ölçüldü. Şekil 23'te KP1 için α-amilaz aktivitesinin Mn⁺² ve Cu⁺² iyonlarının bulunduğu ortamda arttığı, %1'lik SDS ve Ca⁺² bulunan ortamda aktivitenin azaldığı, Hg⁺² iyonu bulunan ortamda ise aktivitenin tamamen kaybolduğu görülmektedir. Şekil 24'te DV3 için ise test edilen tüm ajanların inhibisyon etkisi yaptığı, Hg⁺² iyonu bulunan ortamda ise aktivitenin tamamen kaybolduğu görülmektedir.



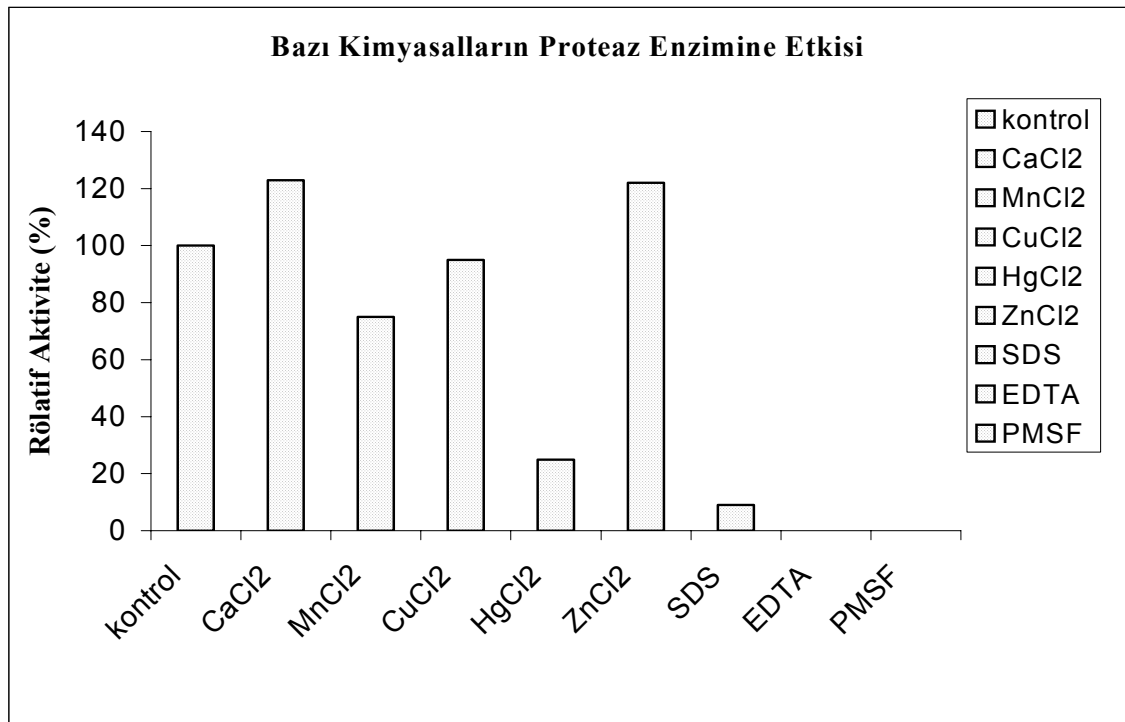
Şekil 24: Bazı Kimyasalların DV3'den Elde Edilen Amilaz Aktivitesine Etkisi



Şekil 25: Bazı Kimyasalların KP 1'den Elde Edilen Proteaz Aktivitesine Etkisi

Proteaz enziminin aktiviteleri üzerine ağır metallerin etkisini belirlemek için 50 mM'lık CaCl₂, CuCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, HgCl₂ stok çözeltileri ve %1'lik SDS hazırlandı ve enzim aktivite tayininde kullanılan toplam hacimde 1,5 mM konsantrasyonunda olacak şekilde kullanıldılar. İzolatlar NB besiyerinde optimum sıcaklık, pH ve inkübasyon

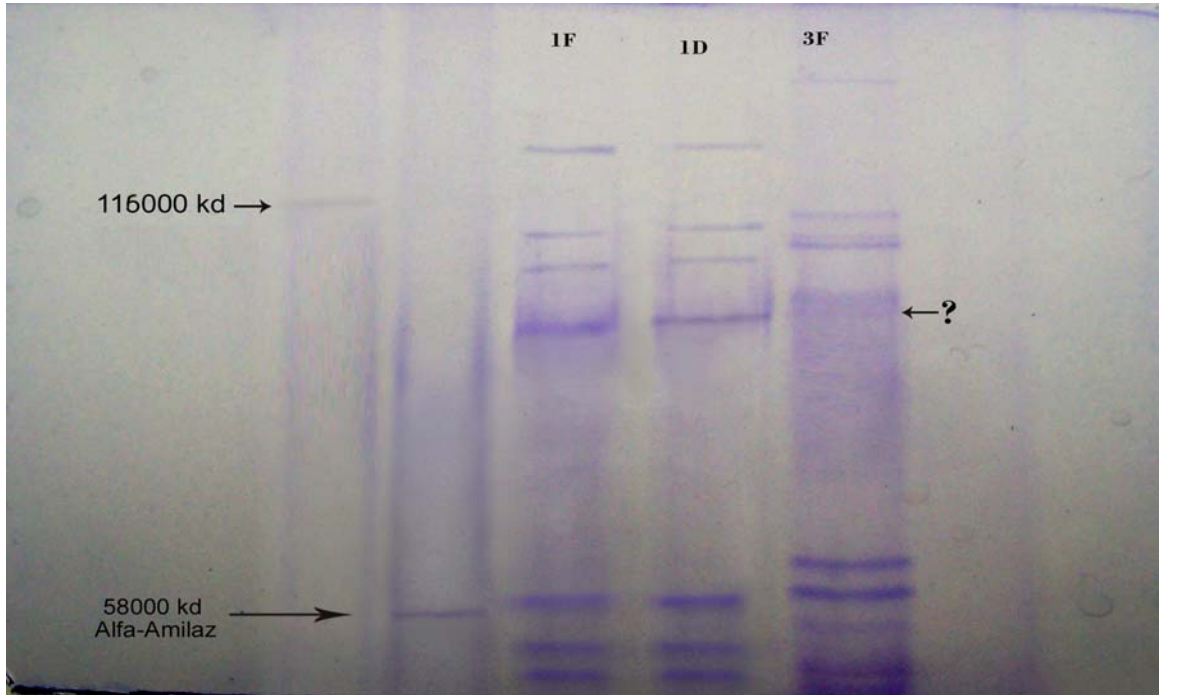
süresinde üretildi. Elde edilen fermente sıvı santrifüj edilerek üst sıvıları enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere çöktürme ve diyaliz işlemlerine tabi tutulduktan sonra elde edilen sıvı, yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan kimyasallarla etkileştirildi ve aktiviteleri ölçüldü. Şekil 25'te KP1 için proteaz aktivitesinin Ca^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarının bulunduğu ortamda arttığı, Hg^{+2} Zn^{+2} , EDTA, %1'lik SDS bulunan ortamda aktivitenin azaldığı, PMSF bulunan ortamda ise aktivitenin tamamen kaybolduğu görülmektedir. Şekil 26'da DV3 için Ca^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarının bulunduğu ortamda enzim aktivitesinin arttığı, Hg^{+2} , %1'lik SDS bulunan ortamda aktivitenin azaldığı, EDTA, PMSF bulunan ortamda ise aktivitenin tamamen kaybolduğu görülmektedir.



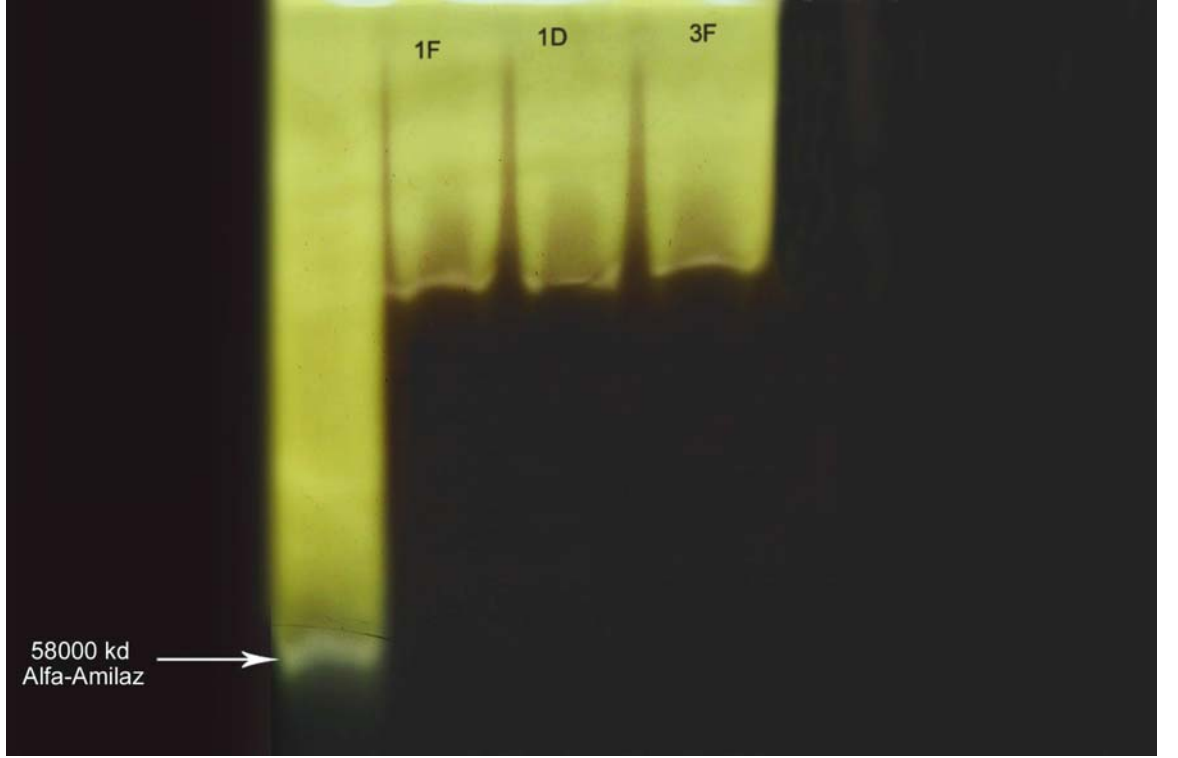
Şekil 26: Bazı kimyasalların DV3'den Elde Edilen Proteaz Aktivitesine Etkisi

4.12. Elektroforez işlemi:

İzolat 1 ve İzolat 3 NB besi yerinde üretildikten sonra, besi yeri 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve elde edilen üst sıvı amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinden geçirilmiş, ayrıca fermantasyon sonucu elde edilen sıvılar %7'lik nondenatüre jel ve %3'lük nişastalı jel hazırlanarak jellerde oluşturulan kuyucuklara sırasıyla standart proteinler (β -galaktozidaz, α -amilaz) 1F, 1D, 3F, 3D olacak şekilde yükleme yapılarak paralel olarak elektroforetik işleme tabi tutulmuşlardır. Bu işlem sonucunda elektroforeze uygulanan 1F, 1D ve 3F'ye ait protein örnekleri ve standart olarak kullanılan α -amilaz (58kD) ve β -galaktozidaz (116 kD) protein elektroforetik göçü Resim 20'de görülmektedir.



Resim 20: Nondenatüre Jel Elektroforezi



Resim 21: %3'lük nişastalı jel elektroforezi

Resim 21'de nişastasız jele paralel olarak hazırlanan ve aynı koşullarda elektroforeze tabi tutulan nişastalı jelin, elektroforezden sonra üzerine iyodür çözeltisi döküldükten sonra iyodürle koyu menekşe rengine dönüştüğü ve ticari α -amilaz ile jele uygulanan örneklerin ilerledikleri kuyucuklarda (1F, 1D, 3F) %3'lük nişastalı jelin parçalandığı görülmektedir. Bu da amilazın varlığını göstermektedir. İzolatlardan elde edilen α -Amilaz'ın molekül ağırlığının *Bacillus subtilis*'e ait α -Amilaz'dan (58 kD) daha büyük olduğu görülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ:

Sıcak su kaplıcalarından izole edilen termofil bakterilerin endüstriyel amaçlı kullanılan enzimlerin kaynağı olmaları nedeniyle oldukça önem arz etmelerinden dolayı bu çalışmada, Diyardin ilçesi sıcak su kaynaklarından alınan su ve çamur örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal analizleri yapıldı. Ayrıca izole edilen bu bakterilerin ekstraselüler α -amilaz ve proteaz enzim üretimi ve bu enzimlerin bazı özellikleri üzerinde çalışmalar yapıldı.

İzole edilen bakterilerden 1 nolu bakterinin çubuk şeklinde, gram pozitif, spor oluşturan, hareketli, ılımlı termofil, olduğu ve 3 nolu bakterinin ise çubuk şeklinde, gram pozitif, spor oluşturan, hareketsiz ve ılımlı termofil olduğu belirlendi. Yapılan biyokimyasal ve fizyolojik testler sonucunda izolat 1 ve izolat 3'ün birbirine çok benzediği görülmüştür. Hareket özelliği dışında büyüme sıcaklığı ve pH aralığı da farklılıklar arz eden bu izolatların Tablo 2'de de görüldüğü gibi *Bacillus*, *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinsinin özelliklerine benzerlikler gösterdiği ve büyük ihtimalle bu cinslere ait tür veya alt türler olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, izole edilen bakteriler uygun besi ortamında 4-64 saat arasında inkübasyona bırakıldı ve 1 nolu izolatın 28 saatte, 3 nolu izolatın 24 saatte optimum üreme gösterdiği, pH 4,5-11 arasında pH denemeleri yapıldı ve optimum üreme pH'sının 1 ve 3 nolu izolatlar için sırasıyla 8 ve 7 olduğu, 15 °C - 75 °C arasında sıcaklık denemeleri yapıldı ve optimum üreme sıcaklıklarının ise 1 ve 3 nolu izolatlar için sırasıyla 50 °C ve 55 °C olduğu tespit edildi.

Derekova ve ark. (2007), Rupi Basin (Bulgaristan)'deki sıcak su kaynağından izole edilen yeni termofilik *Bacillus* üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Bu izolatların Gram pozitif, spor oluşturan, termofilik, zorunlu aerobik olduğunu belirlemişlerdir.

Poli ve ark. (2006), Rittmann dağından bakteri izole etmişlerdir ve bu bakterilerin spor oluşturan, aerobik, termofilik *Anoxybacillus* cinsi bakteriler olduğunu ve büyüme sıcaklığını 45-55 °C (optimum 61 °C) ve pH'sını 5.0-6.5 (optimum 5.6) olarak bulmuşlardır.

Berber ve Yenidünya (2005), beş referans *Bacillus* türü ve Van Gölü suyu ve çevresindeki topraklardan izole edilen toplam on yedi yerel alkalofilik *Bacillus* izolatı fenotipik özelliklerini belirlemişlerdir. Fenotipik özelliklerine göre, yerel izolatların

tümünün Gram pozitif, aerobik, endospor oluşturan, hareketli ve fakültatif alkalofilik *Bacillus* cinsine ait türler olduğu belirlenmiştir.

Kevbrin ve ark. (2005), jeotermal kaynaklarından termofilik bakteri izole etmişlerdir. İzole edilen bakterilerin spor oluşturan, hareketli, fakültatif aerob, Gram pozitif, çubuk şeklinde bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir.

Mutzel ve ark. (2004), *Bacillus sp.* A2 olarak adlandırılan termofilik bakteriyi, İzlanda'da sıcak bir su kaynağının su ve çamur örneğinden izole etmişlerdir. *Bacillus sp.* A2'nin Gram pozitif, spor oluşturan çubuk şeklinde olduğunu belirlemişler ve bu izolatin optimum büyüme sıcaklığının 65°C olduğunu bulmuşlardır.

Hawumba ve ark. (2002), Kuzey Uganda'daki sıcak su kaynaklarından *Geobacillus* cinsi termofilik mikroorganizma izole ederek bu mikroorganizmaların proteolitik, aerobik, çubuk şeklinde, Gram pozitif, spor oluşturan bakteriler olduğunu ve bu bakterilerin optimum üreme koşullarının 60-62°C ve pH 7,5-8,5 aralığında olduğunu bulmuşlardır.

Logan ve ark. (2000), Rittmann dağı ve Melbourne dağı toprak örneklerinden bakteri izole etmişlerdir ve bu bakterilerin spor oluşturan, aerobik, termofilik olduğunu ve bu bakterilerin optimum büyüme sıcaklığını ve pH'sını sırasıyla 50 °C ve 5,5 olarak bulmuşlardır.

Caccamo ve ark. (2000), İtalya'da Vulcano adasındaki hidrotermal kaynaklardaki sedimentlerden bakteri izole etmişlerdir. Bu bakterilerin fenotipik ve moleküler analizlerini yapmışlar ve bunların spor oluşturan, termofilik yeni *Bacillus* türü bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir.

Beldüz ve ark. (2003), Türkiye'nin Balıkesir ve Ağrı illerinin sırasıyla Gönen ve Diyadin sıcak su kaynaklarının çamur ve su örneklerinden elde edilen izolatların fakültatif anaerob *Anoxybacillus* bakteriler olduğunu tespit etmişlerdir.

Yukarıda belirtilen çalışmalarda sıcak su kaynaklarından izole edilen, endospor oluşturan, Gram pozitif basillerin pek çok bakımdan benzerliklere sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca bu çalışmalar elde ettiğimiz bu izolatların (KP1 ve DV3) hem morfolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından hem de izolatların üremesi ve gelişmesi için belirlenen optimum sıcaklık ve pH özellikleri bakımından *Bacillus*, *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinsinin özelliklerine benzerlikler gösterdiğini destekler

niteliktedir. KP1 ve DV3'ün kesin tanımlanması için ileri düzeyde identifikasyon tekniklerinin uygulanması da gerekmektedir.

Bu çalışmada, elde edilen izolatların ekstraselüler α -amilaz enzimi üretme yetenekleri araştırıldı. İzolat 1 için 4-64. saatler arasında α -amilaz aktivite tayini yapıldı ve maksimum enzim aktivitesi 40. saatte (21,96 U/mg) elde edildi. Enzim aktivitesi için optimum koşullar ve enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların etkisi araştırıldı. Buna göre 1 nolu izolat için pH değişimine bağlı α -amilaz aktivitesini tespit etmek için pH 4-11 aralıklarında aktivite ölçüldü ve optimum pH'nın 8 olduğu, enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için ise, 30°C ile 90°C arasında aktivite ölçüldü ve optimum sıcaklığın 60 °C olduğu belirlendi. Ayrıca, izolat 1 (KP1)'in ekstraselüler α -amilaz aktivitesinin 1,5 mM Mn⁺² ve 1,5 mM Cu⁺² iyonlarının bulunduğu ortamda arttığı, %1'lik SDS bulunan ortamda aktivitenin azaldığı, 1,5 mM Hg⁺² iyonu bulunan ortamda ise aktivitenin tamamen kaybolduğu belirlendi.

İzolatın 3 için 4-64. saatler arasında α -amilaz aktivite tayini yapıldı ve maksimum enzim aktivitesi 24. saatte (32 U/mg) elde edildi. 3 nolu izolat için pH değişimine bağlı α -amilaz aktivitesini tespit etmek için pH 4-11 aralıklarında aktivite ölçüldü ve optimum pH'nın 7 olduğu, enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için ise, 30°C ile 90°C arasında aktivite ölçüldü ve optimum sıcaklığın 70 °C'de olduğu belirlendi. İzolat 3 (DV3)'ün α -amilaz aktivitesinin 1,5 mM Hg⁺² iyonu bulunan ortamda tamamen kaybolduğu tespit edildi.

Kıran ve ark. (2005), termofilik *Bacillus* sp. K-12'nin, amilaz üretimi üzerinde çalışmışlar ve çeşitli kimyasalların etkisini araştırmışlardır. Termofilik bakteri Kahramanmaraş'ta bulunan Zeytinli Ilıcası'ndan alınan toprak örneklerinden izole edilmiş ve çalışılan enzimin optimum sıcaklığı 42 °C olarak bulunmuştur.

Bahçeci (2004), Tuz gölünden onbir bakteri izole etmiş ve bu izolatların endüstriyel öneme sahip ksilanaz, selülaz, alfa-amilaz ve proteaz enzimlerini üretip üretmediklerini araştırmıştır. Enzimlerin sıcaklık ve pH aralıkları 60-80 °C ve 7.0-8.0 arasında denemiştir. Alfa amilaz enziminin optimum sıcaklık ve pH'sının 80°C ve 9.0 olduğu saptanmıştır.

Asgher ve ark. (2006), nişasta işlemek amacıyla termofilik *Bacillus subtilis*'ten termostabil amilaz elde etmişlerdir. Maksimum enzim üretiminin 72 U/ml olarak 48. saatte, pH 7'de ve 50 °C'de olduğunu belirlemişlerdir. Termostabil amilaz

aktivasyonunun Ca^{+2} ile arttığını Co^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} iyonları varlığında tamamen inhibe olduğunu ve Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} s iyonlarının varlığında daha az inhibe olduğunu bulmuşlardır.

Najafi ve ark. (2005), topraktan *Bacillus subtilis* AX20'ten ürettikleri ekstraselüler α -amilaz enziminin optimum sıcaklığını $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, optimum pH'sını 6 olarak belirlemişlerdir. Ekstraselüler α -amilaz enziminin aktivitesi üzerine ağır metallerin etkisini araştırarak Hg^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+2} iyonları ve EDTA ile enzimin inhibisyona uğradığını belirlemişlerdir.

Conderio ve ark. (2002), termofilik *Bacillus sp.*'den α -amilaz üretiminin 48. saatte, optimum sıcaklığın $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve optimum pH'nın 7,5 olduğunu belirlemişlerdir.

Mamo ve ark. (1999), termofilik *Bacillus subtilis*'den elde ettikleri ekstraselüler α -amilaz enziminin optimum sıcaklığının $75\text{-}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve pH'nın 5,5 olduğunu belirlemişlerdir. Termofilik *Bacillus subtilis*'den elde ettikleri ekstraselüler α -amilaz enzim aktivasyonunun Hg^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} iyonları tarafından inhibisyona uğradığını ve Zn^{+2} iyonunun inhibisyon yaratmadığını belirlemişlerdir.

Sarikaya ve Gürgün (2000), *Bacillus* suşlarından amilaz enziminin üretimi için tüm suşlarda optimum sıcaklığı $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak, *B. subtilis* için optimum pH 7, *B. amyloliquefaciens*'in her iki suşu için ise 5.9 olarak bulmuşlardır.

Stefanova ve Emanullova (1992), termofilik *Bacillus sp.*'den elde ettikleri termostabil amilaz enziminin karakterizasyonu üzerinde çalışmalar yapmıştır ve Ca^{+2} , Na^{+2} iyonlarının enzim stabilizasyonunu arttırdığını bulmuştur.

Yukarıda yapılan çalışmalarda termofilik bakterilerden elde edilen ekstraselüler α -amilaz enziminin optimum koşulları belirlenmiştir ve belirtilen bu çalışmaların hepsinde enzimin optimum $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve ya yukarıdaki sıcaklıklarda aktivite gösterdiği görülmektedir. İzole ettiğimiz bakterilerden elde ettiğimiz ekstraselüler α -amilaz enziminin KP1 için optimum $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve DV3 için optimum $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta aktivite göstermesi bu izolatlardan elde edilen α -amilaz enziminin termostabil olduğunu göstermektedir ve yukarıda bahsedilen çalışmalar bunu destekler niteliktedir.

Ekstraselüler proteaz enzimi üzerinde yapılan çalışmalarda İzolat 1 (KP1) için; 4-64. saatler arasında enzimin aktivitesi ölçüldü ve maksimum 24. saatte (771 U/mg) aktivite elde edildi. 1 nolu izolat için pH'ya bağlı proteaz aktivitesini belirlemek için pH'sı 4-11 aralıklarında aktivite tayini yapıldı ve aktivitenin optimum pH'sının 9

olduğu, sıcaklığa bağlı enzim aktivitesini belirlemek için 30°C ile 90°C arasında aktivite tayini yapıldı ve optimum sıcaklığın 50 °C’de olduğu belirlendi. İzolat 1 (KP1) için proteaz aktivitesinin 1,5 mM Ca⁺² ve 1,5 mM Cu⁺² iyonlarının bulunduğu ortamda arttığı, 1,5 mM Hg⁺² iyonu 1,5 mM EDTA, %1’lik SDS bulunan ortamda aktivitenin azaldığı, ve 1,5 mM PMSF bulunan ortamda ise aktivitenin tamamen kaybolduğu belirlendi.

İzolat 3 için ise 4-64. saatler arasında proteaz enziminin aktivitesi ölçüldü ve maksimum 36. saatte (421 U/mg) elde edildi. Proteaz enzimi için optimum sıcaklık ve pH’nın sırasıyla 50 °C ve 10 olduğu belirlendi. İzolat 3 (DV3) için 1,5 mM Ca⁺² ve 1,5 mM Zn⁺² iyonlarının bulunduğu ortamda proteaz aktivitesinin arttığı, 1,5 mM Hg⁺², %1’lik SDS bulunan ortamda ise aktivitenin azaldığı, 1,5 mM EDTA, 1,5 mM PMSF bulunan ortamda ise aktivitenin tamamen kaybolduğu tespit edildi.

Arulmani ve ark. (2007), *Bacillus laterosporus*’dan serin proteaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Enzimin optimum 75 °C ve pH 9’da aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. *Bacillus laterosporus*’dan serin proteaz enziminin PMSF ile inhibe edildiğini, Ca⁺², Mg⁺² iyonlarının varlığında ise proteaz aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir.

Park (2004), *Bacillus* cinsi (*B. subtilis*, *B. aeromonas*, *B. hydrophila*, *B. amyloliquefaciens*) bakterilerini izole etmiştir. Bu bakterilere ait proteolitik aktivitelerinin sıcaklık ve pH aralıklarının sırasıyla 40-70°C ve 8,0-8,5 olduğunu belirlemiştir. İzole ettiği bakterilerin proteolitik aktivitelerinin PMSF ile kısmi olarak inhibe olduğunu belirlemiştir.

Nascimento ve Martins (2003), termofilik *Bacillus* türü bakterinin ekstraselüler proteaz enziminin optimum 24. saatte, 60 °C, pH 8’de üretildiğini bulmuşlardır. Termofilik *Bacillus* cinsi bakterinin ekstraselüler proteaz enziminin K, Hg⁺², Cu⁺² iyonlarının bulunduğu durumda aktivasyonunun inhibe olduğunu, Mn⁺², Ca⁺² iyonlarının bulunduğu ortamda ise enzim aktivasyonunda artış gösterdiğini bulmuşlardır.

Ghorbel ve ark. (2002), *Bacillus* tarafından üretilen proteaz enziminin stabilitesi üzerinde çalışmalar yapmışlar ve optimum proteaz aktivitesi sıcaklığını 60 °C, optimum pH’sını 8 olarak bulmuşlardır. *Bacillus* cinsi bakteri tarafından üretilen proteaz enziminin Ca⁺² (2 mM) bulunan ortamda aktivitesinin arttığını, Zn⁺² ve Cu⁺² nin aktivite

üzerine inhibitör etkisinin olduğunu, EDTA tarafından ise aktivitenin tamamen yok ettiğini tespit etmişlerdir.

Beg ve Gupta (2002), *Bacillus mojavensis* tarafından üretilen serin alkalin proteaz enziminin karakterizasyonu ve saflaştırılması üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Enzimin optimum sıcaklığını 60 °C, optimum pH'sını 8 olarak bulmuşlardır. *Bacillus mojavensis* tarafından üretilen serin alkalin proteaz enziminin aktivitesinin metal iyonlarından Cu^{+2} ve Mn^{+2} 'nin bulunduğu ortamda enzim aktivitesinde artışı sağladığını, PMSF'nin aktiviteyi yok ettiğini tespit etmişlerdir.

Johnvesly ve Naik (2001), termofilik ve alkalofilik *Bacillus* sp.'den termostabil proteaz üretimi üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Optimum proteaz aktivitesini 70 °C ve pH 11'de tespit etmişlerdir. Termofilik ve alkalofilik *Bacillus* sp.'den termostabil proteaz aktivitesinin 1 mM PMSF ve 10 mM Fe^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} ile inhibisyona uğradığını, 10 mM Mn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} iyonları ile aktivitenin arttığını tespit etmişlerdir.

Sookkheo ve ark. (2000), *Bacillus stearothermophilus* tarafından üretilen ekstraselüler proteaz enziminin aktivite gösterdiği optimum sıcaklıkları 70, 85, 90 °C olarak ve optimum pH'yi da 7,0 olarak belirlemişlerdir. *Bacillus stearothermophilus* tarafından üretilen ekstraselüler proteaz enziminin aktivitesi üzerinde 5 mM CaCl_2 'nin aktivite artışı sağladığı ve EDTA'nın inhibisyona sebep olduğunu belirlemişlerdir.

Matta ve Punj (1998), *Bacillus polymyxa* B-17'den elde ettikleri termostabil proteaz enziminin aktivasyonunun optimum sıcaklığı 70 °C ve pH aralığını 5,5-10'da deneyerek optimum pH'yi 7,5 olarak bulmuşlardır. *Bacillus polymyxa* B-17'ten elde ettikleri termostabil proteaz enziminin aktivasyonuna çeşitli metaller ve metal bağlayıcı ajanların etkisini araştırarak Cu^{+2} ve EDTA'nın inhibitör etkisinin olduğunu ve Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Co^{+2} 'nin enzim üzerinde inhibisyon etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir.

Tsuchya (1991), proteaz enziminin aktivitesinin optimum pH'sını (37°C'de) pH 11.5-13.0 ve optimum sıcaklığını (pH 11.5'te) 70°C olarak belirlemişlerdir. Proteolitik aktivite gösteren serin proteaz aktivitesi üzerine, PMSF, metal iyonlar, Cu^{2+} ve Hg^{2+} 'in aktif alan engelleyicileri olduğunu belirlemişlerdir.

Zvidzai ve Zvauya (2000), proteaz enzim aktivitesinin 2,5 mM PMSF ile Ag^{+2} ve Hg^{+2} metal iyonlarıyla inhibe olduğunu, ayrıca Mn^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} iyonlarının varlığında aktivite artışının sağlandığını belirlemişlerdir.

Proteaz enzimi ile ilgili olarak yapılan ve yukarıda belirtilen bu çalışmalarda enzim aktivasyonunun optimum koşulları belirlenmiş ve proteaz enzimin termostabil olduğu, bazı kimyasalların proteaz enzimi aktivitesine etkisi belirlenmiştir. Ayrıca yaptığımız bu çalışmada izolatlardan elde ettiğimiz proteaz enziminin aktivitesinin optimum pH 9-10 arasında elde edilmesi ve metal iyonlarından Ca^{+2} bulunan ortamda aktivitenin artış göstermesi, PMSF bulunan ortamda enzim aktivasyonunun tamamen kaybolması çalışılan proteazın serin proteaz olduğunu göstermektedir ve yukarıda bahsedilen çalışmalar da bunu desteklemektedir.

Sıcak su kaynaklarından izole edilen KP1 ve DV3 izolatlarının ılımlı termofil ve üretilen ekstraselüler amilaz ve proteaz enzimlerinin tespit edilen optimum şartları (pH , sıcaklık, inhibisyon vs) bu enzimlerin endüstride kullanılma potansiyellerinin mevcut olduğunu göstermektedir. Ayrıca iki izolatın ürettiği amilazın elektroforetik analizi bu enzimin iki izolat için yakın moleküler ağırlığa sahip olduğu ve *B.subtilis* amilazından (58 kD) büyük oldukları görülmektedir. Bu enzimlerin saflaştırılıp bazı özelliklerinin ileri düzeyde araştırılması gerekmektedir.

REFERANSLAR:

AGÜLOĞLU S., 1996. Değişik Amino Asit ve Antibiyotiklerin *Bacillus subtilis* α -Amilazın Membrandaki Sentezi ve Salgılanması Üzerine Etkileri ve Tripsinin α -Amilaz Üzerine Olan Proteolitik Etkisinin İncelenmesi. Doktora Tezi, D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır

AMANO ENZYME INCORPORATION,

<http://www.amano-enzyme.co.jp/english/enzyme/industry.html>

ASLIM B., SAĞLAM N., BEYATLI Y., 2002. Determination of Some Properties o *Bacillus* Isolated from Soil. Turk. J. Biol. 26, 41-48

APAR K. D., ÖZBEK B. 2004. α -Amylase Inactivation by Temperature During Starch Hydrolysis. Process Biochem. vol.39, p.1137-1144

ARDA, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara

ARULMANI. M., APARANJINI.K., VASANTHI. K., ARUMUGAM. P., ARIVUCHELVI. M., and KALAICHELVAN. P. T., 2007. Purification and Partial Characterization of Serine Protease from Thermostable Alkalophilic *Bacillus laterosporus-AK1*. World journal of Microbiology Biotechnology. vol. 23, p. 475–481

ASGHER A. M., ASAD J. A. M., RAHMAN B. S.U., LEGGE. R.L., 2007. A Thermostable α -Amylase from a Moderately Thermophilic *Bacillus subtilis* Strain for Starch Processing. Journal of Food Engineering. vol. 79, p. 950–955

ATLAS. M.R., 1995. Microorganisms in Our World. Mosby- Year Book. Missouri. Chapter 1. p. 20-23

BAHÇECİ, H., 2004. Tuz Gölü Bakteri İzolatlarının Yağ Asidi Metil Ester Analizi ve Hücre Dışı Enzimlerinin Karakterizasyonu. Master Tezi, ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

BAJPAI, P., BAJPAI, K.P., 1987. High-Temperature Alkaline α -Amylase from *Bacillus lichneiformis* TCRDC-B13. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 33, p. 72-78.

BANERJEE, U.C., SANI, R.K., AZMI, W., SONI, R., 1999. Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus brevis* and its Characterization as a Laundry Detergent Additive. *Process Biochemistry*. vol. 35, p. 213-219

BEG. Q.R., GUPTA. R., 2003. Purification and Characterization of an Oxidation-Stable, Thiol- Dependent Serine Alkaline Protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology*. vol.32, p. 294-304

BELDUZ. A.O., DULGER. S., DEMIRBAG. Z., 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., Moderately Thermophilic, Xylose-Utilizing, Endospore-Forming Bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. vol. 53, p. 1315-1320

BENJAMIN. W., PARSONS. K., 1991. Essentials of Medical Microbiology. J: B Lippincott Company, USA. p. 223-234

BERBER, İ., YENİDÜNYA. E., 2005. Identification of Alkaliphilic *Bacillus* Species Isolated from Lake Van and Its Surroundings by Computerized Analysis of Extracellular Protein Profiles. *Turkish Journal of Biology*. vol. 29, p. 181-188

BERNFELD P., 1955. Enzymes Carbohydrate Metabolism, In Methods In Enzymology Academic press, vol.17 p.149-158

BILGEHAN. H., 2002. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Meta Basım. Fakülteler Kitabevi, Barış yayınları. p.4-10

- BLACK. J.G., 1996. Microbiology Principles and Applications. Prentice-Hall. New Jersey, USA. Chapter 10, p. 247-264
- BOLTON. D. J., KELLY. C. T., and FOGARTY. W. M., 1997. Purification and Characterization of α -amylase of *Bacillus jlavothermus*. *Enzyme and Microbial Technology*. vol.20, p.340-343,
- BRENA, B. M. PAZOS C., FRAGUAS L. F., VIERA F. B.. 1996. Chromatographic Methods for Amylases. *Journal of Chromatography Biomedical Applications*, vol. 684, p. 217-237
- BROOKS. G.F., BUTEL. J.S, ORNSTON. L.N., 1991. Medical Microbiology. Middle East Edition Appleton and Longa. USA. Chapter 12, p. 180-189
- BROSNAN. M. P., KELLY. C. T., and FOGARTY. W. M., 1992. Investigation of the Mechanisms of Irreversible Thermoinactivation of *Bacillus stearothermophilus* α -Amylase. *Eur. J. Biochem*. vol.203, p.225-232
- BUONOCORE. V., CAPORALE. C., ROSA. M., GAMBACOTA. A., 1976. Stable, Inducible Thermoacidophilic α -Amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology*. vol. 128, p. 515-521
- BURG. B. V. D., 2003. Extremophiles as a Source for Novel Enzymes. *Current Opinion in Microbiology*. vol.6, p.213-218
- CACCAMO. D., GUGLIANDOLO. C., STACKEBRANDT. E., and MAUGERI. T. L., 2000. *Bacillus vulcani* sp. a Novel Thermophilic Species Isolated from A Shallow Marine Hydrothermal Vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. vol.50, p.2009-2012

CARPENTER. P.L., 1972. Microbiology. W.B. Saunders Company. Canada, Chapter 4, p. 64-77

CASTRO. G.R., 1999. Enzymatic activities of Proteases Dissolved in Organic Solvent. *Enzyme and Microbial Technology*. vol.25, p. 689-694

COHN, F., 1875. Untersuchungen Tiber Bacterien. *Beihge zur Biologie der Pflanzm*, vol.1, p. 127-222.

CORAL. G., ÇOLAK. Ö., 2000. Bir *Aspergillus niger* İzolatına Ait Glikoamilaz Enziminin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. *Turkish Journal of Biology*. vol. 24, p. 601-609

CORDEIRO. C. A. M., MARTINS. M. L. L., LUCIANO. A. B., 2002. Production and Properties of α -Amylase from Thermophilic *Bacillus* sp. . *Brazilian Journal of Microbiology*. vol.33, p.57-61

DAĞAŞAN L., 1997. Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar Bölüm 15, Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E.M.T.U)

DANIELS, M.J., 1992. Using Biological Enzymes in Papermaking. *Paper Technology*, vol. 33, p. 14

DEFLAUNA. M.F., FREDRICKSONB. J.K., DONGC. H., PFIFFNERD. S.M., ONSTOTTE. T.C., BALKWILLF. D.L., STREGERG. S.H., STACKEBRANDTH, E. KNOESSENI, S., 2007. Isolation and Characterization of a *Geobacillus thermoleovorans* Strain from an Ultra-Deep South African Gold Mine. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 30, p.152–164

DEMIRJIAN. D. C., VARAS. F. M., and CASSIDY. C. S., 2001.. Enzymes from Extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*. vol.5, p.144-151

DEREKOVA. A., SJOHOLM. C., MANDEVA. R., KAMBOUROVA. M., 2007. *Anoxybacillus rupiensis* sp. Nov., a Novel Thermophilic Bacterium Isolated from Rupi Basin (Bulgaria). *Extremophiles*. vol. 10, p. 1-4

DRIKS. A., 2006. Development in Bacteria, Spore Formation in *Bacillus subtilis*. Mol. Life Sci. vol.59, p. 389–391

DROBNIEWSKI. F. A., 1993., *Bacillus cereus* and Related Species. *Clinical Microbiology Reviews*. vol.6, p.324-338

D'SOUZA D. R., MORGAN R. D., PARASHAR V., CAPALASH N. AND SHARMA P. 2004. Characterization of BfII – a thermostable, Co⁺⁺-requiring isoschizomer of BsiYI from *Anoxybacillus flavithermus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* vol. 20, p. 593–598

ENZYME ESSENTIAL, <http://www.enzymeessentials.com/HTML/protease.html>

EREN. K. Ö., ARIKAN. B., *Bacillus sp.* Suşlarında Antibiyotik, Selülaz ve Amilaz Üretiminden Sorumlu Genlerin Protoplast Transformasyon Tekniği ile Gr(+) Bakterilere Transferi ve Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi

FRITZE. D., 2004. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. The American Phytopathological Society Publication vol. 94, p. 11

GEST., H., 1999. Bacterial Classification and Taxonomy a 'Primer' for The New Millennium. Microbiology Today vol. 27, p. 70-72

GHORBEL. B., KAMOUN. A.S., NASRI. M., 2003. Stability Studies of Protease *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*. vol. 32, p. 513-518

GÖZÜKARA E.M. 2001, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara s. 225-577

GUPTA. R., GIGRAS. P., MOHAPATRA. H., GOSWAMI. V.K., CHAUHAN. B., 2003. Microbial α -Amylase: Biotechnological Perspective. *Enzyme and Microbial Technology*. vol. 38, p. 1599-1616

GUPTA. A., ROY. I., PATEL. P. K., SINGH. S.P., KHARE. S.K., GUPTA. M.N., 2005. One-Step Purification and Characterization of Alkaline Protease from Haloalkaliphilic *Bacillus sp.* *Journal of Chromatography*. p. 103-108

HAKI. G. D., RAKSHIT. S. K., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes a Review. *Bioresource Technology*. vol. 89, p. 17-34

HAMILTON L.M., KELLY C.T., FOGARTY W.M. 1999. Production and Properties of The Starch-Digesting α -amylase of *Bacillus sp.* IMD 435. *Process Biochemistry*, vol. 35, p. 27-31,

HAQ. I., ASHRAF. H., IQBAL. J., QADEER. M.A., 2003. Production of Alpha Amylase by *Bacillus licheniformis* Using an Economical Medium. *Biosource Technology*. vol. 87, p. 5-61

HASHIM S.O., DELGADO. O.S., MARTINEZ. M. A., KAUL. R.H., MULAA. F.J., MATTIASSON. B., 2005. Alkaline Active Maltohexaose-Forming α -Amylase from *Bacillus halodurans* LKB 34. *Enzyme and Microbial Technology*. vol. 36, p. 139-146

HAWUMBA. J. F., THERON. J., BROŹE. V. S., 2002. Thermophilic Protease-Producing *Geobacillus* from Buranga Hot Springs in Western Uganda. *Current Microbiology*. vol.45, p. 144–150

ILKER C. E., 2004. Köy Köy Türkiye Yol Atlası, Map Medya Basın Yayın, Pazarlama ve Danışmanlık Ltd., İstanbul, s. 95

IMHOFF J.F. 2003. Phylogenetic Taxonomy of The Family Chlorobiaceae on The Basis of 16S rRNA and Fmo (Fenna-Matthews-Olson Protein) Gene Sequences. Int J Syst Evol Microbiol. vol.53, p. 941-51

JANSTOVA B., LUKASOVA J., DRAKOVA M., VORLOVA L. 2004. Influence of *Bacillus spp.* Enzymes on Ultra High Temperature-treated Milk Proteins, *Acta Vet. Brno* vol.73, p. 393–400

JOHNVESLY. B., NAIK. G. R., 2001.. Studies on Production of Thermostable Alkaline Protease from Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. Jb-99 in a Chemically Defined Medium. *Process Biochemistry.* vol. 37, p. 139-144,

KANDRA L. 2003. α -Amylases of Medical and Industrial Importance; *Journal of Molecular Structure (Teochem).* vol. 666 , p. 487-498

KAUR, S., VOHRA, R.M., KAPOOR, M., BEG, Q.K., HOONDAL, G.S., 2001.
Enhanced
Production and Characterization of a Highly Thermostable Alkaline Protease From *Bacillus* sp. P-2. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* vol.17, p. 125-129

KAZAN. D., DENİZCİ. A. A., KERİMAK. M. N., ve ERASLAN. A., 2005. Purification and Characterization of a Serine Alkaline Protease from *Bacillus clausii* *GMBAE 42 J.* Ind Microbiol Biotechnol. Vol. 32, p. 335–344

KEMBHAVI. A., NAJAFI. M. F., 2005. One Step Purification and Characterization of an Extracellular Amylase from Marine *Vibrio sp.* *Enzyme and Microbial Technology.* vol.36, p. 535–539

KEVBRIN. V. V., LYSENKO. K. Z. A. M., WIEGEL. J., 2005. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a Novel Thermophilic Facultative Aerobic Bacterium with a Broad pH Optimum from The Geyser Valley, Kamchatka. *Extremophiles.* vol.9, p.391-398

KIM, J.Y., HUR, S.H., HONG, J.H., (2005). Purification and Characterization of an Alkaline Cellulase from a Newly Isolated Alkalophilic *Bacillus sp.* HSH-810. Biotechnol. Lett. vol. 27, p. 313-316

KINGSBURY. D.T., WAGNER. G.I., 2000. Microbiology. Middle East Edition Harwall Publishing Company, Pennsylvania, USA., Chapter 10, p. 109-117

KIRAN E.Ö., ÇÖMLEKÇİOĞLU U. 2003. Zeytin İlması (Kahramanmaraş)'ndan Termofil Alkalifilik Amilolitik *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu ve Amilaz Üretme Yetenekleri Üzerine Azot Kaynaklarının Etkisi; KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 6(2), s. 41-48,

KIRAN. Ö., ÇÖMLEKÇİOĞLU. U., ARIKAN. B., 2005. Effects of Carbon Sources and Various Chemicals on The Production of a Novel Amylase from a Thermophilic *Bacillus sp.* K-1229 . Turkish Journal of Biology. p. 99-103

KIRAN. E. Ö., ÇÖMLEKÇİOĞLU. U., DOSTBİL. N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1)

KIYMAZ. T., TARAKÇIOĞLU. M., 2006. Biyoteknoloji Alanındaki Gelişmelerin Yansımaları ve Türkiye'nin Politika Seçenekleri. Planlama Dergisi Özel Sayı. s. 235-242

KORKMAZ. A., 2006. Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi Yayını. Tarım İl Müdürlüğü, Samsun

LAEMMLI U.K., 1977. Nature, vol.227, p. 680-685,

LEE, S., MORIKAWA, M., TAKAGI, M., IMANAKA, T., 1994. Cloning Gene and Characterization its Product, α -Amylase, Pullulanase (appt), From Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain XAL601. *Application Environment Microbiology*. vol. 60, p. 3761-3773

LEIFSON. E., 1966. *Bacterial Taxonomy: a Critique*. Bacteriological Reviews Printed by American Society for Microbiology. vol. 30, p. 257-266

LOGAN. N. A., LEBBE. L., HOSTE. B., GORIS. J., FORSYTH. G., HEYNDRICKX. M.,

MURRAY. B. L., SYME. N., WILLIAMS. D. D., and VOS. P. D., 2000. Aerobic Endospore-Forming Bacteria from Geothermal Environments in Northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich Archipelago, with The Proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. vol.50, p. 1741–1753

MADIGAN. M.T., MARTINCO. J.M., PARKER. J., 2003. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall. USA. p. 404-406

MAMO. G., GESSESSE A., 1999. Purification and Characterization of Two Raw-Starch-Digesting Thermostable α -amylases from a Thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*. vol. 25, p. 433–438

MATTA. H., PUNJ. V., 1998. Isolation and Partial Characterization of Thermostable Extracellular Protease of *Bacillus polymyxa* B-17. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 42, p. 139-145

MATZKA J., 2006. *FEMS Microbiology Proteins*, vol. 183, p. 55-56

MAUGERI. T. L., GUGLIANDOLO. C., CACCAMO. D., STACKEBRANDT. E., 2001. Polyphasic Taxonomic Study of Thermophilic Bacilli from Shallow, Marine Vents System. Appl. Microbiol. vol. 24, p. 572–587

MCKANE. L., KANDEL J., 1996. Microbiology Essentials and Applications, Mc Graw-Hill. USA, Chapter 10, p. 238-250

MEDICAL DICTIONARY ONLINE,
<http://www.online-medical-dictionary.org/?q=gamma-Amylase>

MERCAN. N., ÇAĞLAR. A., ASLIM. B., BEYATLI. Y., 2003. Clasification of Strains of *Bacillus sphaericus* by Different Statistical Methods. Turkish Journal of Biology. vol. 27, p. 171-179

MIKROBİYOLOJİ. ORG, <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/210010701.pdf>

MUTZEL, A., REINSCHEID, U. M., ANTRANIKIAN, G., MULLER R., 2004. Isolation and Characterization of a Thermophilic *Bacillus* Strain, that Degrades Phenol and Cresols as Sole Carbon Source at 70 °C. Applied Microbiology and Biotechnology vol. 46, p. 593-596

NAJAFI. M. F., DEOBAGKAR. D., DEOBAGKAR. D., 2005. Purification and Characterization of an Extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. Protein Expression and Purification. vol. 41, p. 349–354

NAJAFI. M. F., SARIRI R. 2006. Extraction and Identification of Alkaline Protease Producing Thermophilic Bacteria from Soil. Master Thesis. Ministry of Science and Technology, Faculty of Science, Iran

NASCIMENTO. W. C., MARTINS. M. L. L., 2003. Production and Properties of an Extracellular Protease from Thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology. vol.35, p.91-96

ÖZATA, A., TÜRE. C., 2001. Enzimler ve Enzim Aktivitelerinin Gösterilmesi. AÖF Yayınları, Eskişehir

ÖZDEMİR. S., 2004. *Musa textilis* Kabuğu Kullanılarak Katı-Faz Fermantasyon Tekniği ile (SSF) *Bacillus sp*'de α - Amilaz Üretilmesi. Yüksek Lisans Tezi. D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır

ÖZŞAHİN A.D., 2006. Kahramanmaraş ili Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzolasyonu Yapılan *Bacillus Sp.* Suşlarından Elde Edilen Selülaz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş

PARK I. J., YOON. J. C., PARK S. J., KIM. E. H., CHP.Y. J., SHIN. K. S., 2003. Characterization of the Proteolytic Activity of Bacteria Isolated from a Rotating Biological Contactor. *The Journal of Microbiology*, vol. 41, p. 73-77

PIKUTA E., LYSENKO A., CHUVILSKAYA N., MENDROCK U., HIPPE H., SUZINA N., NIKITIN D.,2000. *Anoxybacillus pushchinensis* a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* .vol, 50, p. 2109–211

POLI. A., ESPOSITO. E., LAMA. L., ORLANDO. P., NICOLAUS. G., APPOLONIA. F. D., GAMBACORTA. A., NICOLAUSA. B., 2006. *Anoxybacillus amylolyticus sp.* nov., a Thermophilic Amylase Producing Bacterium Isolated from Mount Rittmann (Antarctica) *Systematic and Applied Microbiology*. vol.29, p. 300-307

RAMACHANDRAN, S., PATEL, A.K., NAMPOOTHIRI, K.M., CHANDRAN, S., SZAKACS, G., SOCCOL, C.R., PANDEY, A., 2004. Alpha Amylase from a Fungal Culture Grown on Oil Cakes and Its Properties. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. vol. 47 , no. 2

RAMAGOMA, F., 2006. Development of a Lipase Gene Based Expression and Secretion System for the Protein Over-Production in *Bacillus licheniformis*. Master Thesis. Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of the Free State Bloemfontein, Republic of South Africa

SARIKAYA. E., GÜRGÜN. S., 2000. Increase of the α -Amylase Yield by Some *Bacillus* Strains. Turkish Journal of Biology. vol.24, p.299-308

SIERECKA. J.K., 1998. Purification and Partial Characterization of Neutral Protease from a Virulent Strain of *Bacillus cereus*. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. vol. 30, p. 579-595

SHOKRI. M. M., KHAJEH. K., ALIKHAJEH. J., ASOODEH. A., RANJBAR. B., HOSSEINKHANI. S., and SADEGHI. M., 2006. Comparison of The Molten Globule States of Thermophilic and Mesophilic α -amylases. Biophysical Chemistry. vol.122, p. 58-65

SNEATH P. H. A., 1995. Thirty Years of Numerical Taxonomy. The Systematic Biology vol. 44, p. 281—298

SOOKKHEO. B., SINCHAIKUL. S., PHUTRAKUL. S.T.C., 2000. Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. Protein Expression and Purification. vol. 20, p. 142-151

STEFANOVA. M., EMANUILOVA. E., 1992. Characterisation of a Thermostable α -amylase from *Bacillus brevis*. Eur. J. Biochem. vol. 207, p. 345-349

TARİ. C., GENCKAL. H., TOKATLI . F., 2006. Optimization of a Growth Medium Using a Statistical Approach for the Production of an Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus sp.* L21 Process Biochemistry., vol.41, p. 659–665

TELEFONCU A. 1996. Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Fen- Edb. Fak. Yayınları No:159 s. 1-4, İzmir

TEMİZKAN. G., ARDA. N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Kitap Evi. s. 275-280

TOPAL. S, PEMBEÇİ. C., BORCAKLI. M., BATUM. M., ÇELTİK. Ö., 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. Turk J Biol. vol. 24, p. 79-93

TRUPER, H. G., 2005. International Perspectives on Taxonomy from the Past to the Future, vol. 71, p. 273

TSUCHIYA. K., NAKAMURA. Y., SAKASHITA. H., KIMURA. T., 1991. Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Protease from Alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. Biotech. Biochem. vol. 36, p. 246

TURNER. P., MAMO. G., and KARLSSON. E. N., 2007. Potential and Utilization of Thermophiles and Thermostable Enzymes in Biorefining. Microbial Cell Factories. vol. 6:9

VENUGOPAL. M., SARAMMA. A.V., 2006. Characterization of Alkaline Protease from *Vibrio fluvialis* Strain VM10 Isolated from a Mangrove Sediment Sample and Its Application as a Laundry Detergent Additive. Process Biochemistry. vol. 41, p. 1239-1243

WASHINGTON UNIVERSITY IN ST. LOUIS, ART AND SCIENCE,
www.epsc.wustl.edu/.../Homepages/Carrine%20Blank.html.

WATER STRUCTURE AND SCIENCE, <http://www.lsbu.ac.uk/water/hysta.html>

WIKIPEDIA THE FREE ENCYCLOPEDIA, tr.wikipedia.org/wiki/Ni%C5%9Fasta

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

YILMAZ. M., SORAN H., BEYATLI. Y., 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus spp.* strains isolated from the soil. Microbiological Research. vol. 161, p. 127—131

YILMAZ. F., 2002. *Bacillus* Türleri. Bitirme Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi, Rize

ZVIDZAI. C. J., ZVAUYA. R., 2000. Purification of a Protease From an Alkalophilic *Bacillus subtilis* Isolated From a Zimbabwean Hot Spring. Journal of Food Biochemistry. vol 25, p. 1-13

7.TABLolarIN LİSTESİ

Tablo 1: Doğada bulunan ve klasifikasyonu yapılan *Bacillus* cinsi bakteriler

Tablo 2: Çubuk şeklindeki bakterilerin özellikleri

Tablo 3: Endüstriyel önemi olan enzimler ve bu enzimlerin kullanım alanları

Tablo 4: KP1 ve DV3'ün Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

8. ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1: Canlıların filogenetik sınıflandırılması

Şekil 2: Amilaz'un kimyasal yapısı

Şekil 3: Amilopektin'in kimyasal yapısı

Şekil 4: Ağrı ili Diyadin ilçesi sıcak su kaynakları

Şekil 5: İnkübasyon Süresinin KP1'in Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 6: İnkübasyon Süresinin DV3'ün Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 7: Sıcaklığın KP1'in Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 8: Sıcaklığın DV3'ün Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 9: pH'nın KP1'in Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 10: pH'nın DV3'ün Üremesi Üzerine Etkisi

Şekil 11: KP1'in Değişik İnkübasyon Sürelerine Bağlı Amilaz Aktivitesi

Şekil 12: DV3'ün Değişik İnkübasyon Sürelerine Bağlı Amilaz Aktivitesi

Şekil 13: KP1'in Değişik İnkübasyon Sürelerine Bağlı Proteaz Aktivitesi

Şekil 14: DV3'ün Değişik İnkübasyon Sürelerine Bağlı Proteaz Aktivitesi

Şekil 15: KP1'in pH'ya Bağlı Amilaz Aktivitesi

Şekil 16: DV3'ün pH'ya Bağlı Amilaz Aktivitesi

Şekil 17: KP1'in pH'ya Bağlı Proteaz Aktivitesi

Şekil 18: DV3'ün pH'ya Bağlı Proteaz Aktivitesi

Şekil 19: KP1'in Sıcaklığa Bağlı Amilaz Aktivitesi

Şekil 20: DV3'ün Sıcaklığa Bağlı Amilaz Aktivitesi

Şekil 21: KP1'in Sıcaklığa Bağlı Proteaz Aktivitesi

Şekil 22: DV3'in Sıcaklığa Bağlı ProteazAktivitesi

Şekil 23: Bazı Kimyasalların KP1'den Elde Edilen Amilaz Aktivitesine Etkisi

Şekil 24: Bazı Kimyasalların DV3'den Elde Edilen Amilaz Aktivitesine Etkisi

Şekil 25: Bazı Kimyasalların KP1'den Elde Edilen Proteaz Aktivitesine Etkisi

Şekil 26: Bazı Kimyasalların DV3'den Elde Edilen Proteaz Aktivitesine Etkisi

9. RESİMLERİN LİSTESİ

- Resim 1:** Köprü Çermiği
- Resim 2:** Dibekli Köyü Sıcak Su Kaynağı
- Resim 3:** Davutlu Çermiği
- Resim 4:** Kuşburnu Köyü Çermiği
- Resim 5:** KP1'in Gram boyama özelliği
- Resim 6:** DV3'ün Gram boyama özelliği
- Resim 7:** KP1'in spor boyama özelliği
- Resim 8:** DV3'ün spor boyama özelliği
- Resim 9:** KP1'in Nişasta Hidroliz Testi
- Resim 10:** DV3'ün Nişasta Hidroliz Testi
- Resim 11:** KP1'in Katalaz Testi
- Resim 12:** DV3'ün Katalaz Testi
- Resim 13:** KP1'in Kazein Hidrolizi Testi
- Resim 14:** KP1'in Üreaz Testi
- Resim 15:** DV3'ün Üreaz Testi
- Resim 16:** KP1'in Lipaz Testi
- Resim 17:** DV3'ün Lipaz Testi
- Resim 18:** KP1'in Hareket Testi
- Resim 19:** DV3'in Hareket Testi
- Resim 20:** Nondenatüre Jel Elektroforezi
- Resim 21:** %3'lük nişastalı jel elektroforezi

10. ÖZGEÇMİŞİM

1981 Diyarbakır doğumluyum.

1987-1995 Diyarbakır Birlik ilköğretim Okulu'nda ilk ve orta öğrenimimi tamamladım.

1995-1998 Diyarbakır Birlik Lisesi'nde lise öğrenimimi tamamladım.

1999-2003 Dicle Üniversitesi Fen-Edb. Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü okudum.

Eylül 2005'te Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Biyoloji Anabilim

Dalı'nda yüksek lisansa başladım.

Aralık 2005'ten beri Dicle Üniversitesi Fen Edb. Fakültesi Biyoloji Bölümü

Hidrobiyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.