



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**AKASYA AĞACI TOPRAĞINDAN İZOLE
EDİLEN *BACILLUS* SP. TARAFINDAN
ÜRETİLEN ENDÜSTRİYEL ENZİMLERİN
ARAŞTIRILMASI**

HASAN ÜMİT ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Dilek KAZAN

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe OGAN

İSTANBUL, 2013



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**AKASYA AĞACI TOPRAĞINDAN İZOLE
EDİLEN *BACILLUS* SP. TARAFINDAN
ÜRETİLEN ENDÜSTRİYEL ENZİMLERİN
ARAŞTIRILMASI**

HASAN ÜMİT ÖZTÜRK
(141200520060549)

DOKTORA TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Dilek KAZAN

EŞ-DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe OGAN


İSTANBUL, 2013

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Öğrencisi Hasan Ümit ÖZTÜRK'ün "Akasya Ağacı Toprağından İzole Edilen *Bacillus* Sp. tarafından Üretilen Endüstriyel Enzimlerin Araştırılması" başlıklı tez çalışması, 20/06/2013 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

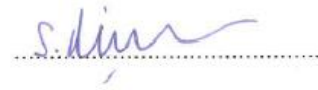
Prof.Dr. Dilek KAZAN (Danışman)
Marmara Üniversitesi



Prof.Dr. Belma KIN ÖZBEK (Üye)
Yıldız Teknik Üniversitesi



Prof.Dr. Sadık DİNÇER (Üye)
Çukurova Üniversitesi



Doç.Dr. Berna SARIYAR AKBULUT (Üye)
Marmara Üniversitesi



Doç.Dr.Gizem DİNLER DOĞANAY (Üye)
İstanbul Teknik Üniversitesi



ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20/07/2013 tarih ve 2017/17-02 sayılı kararı ile Hasan Ümit ÖZTÜRK'ün Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Doktora derecesi alması onanmıştır.


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Abdülkerim KAR
Müdür

MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES
IN PURE AND APPLIED SCIENCES

Hasan Ümit ÖZTÜRK, a Doctor of Philosophy student of Marmara University Institute for Graduate Studies in Pure and Applied Sciences, defended his thesis entitled “Investigating Of Industrial Enzymes From *Bacillus Sp.* Isolated From *Acacia cyanophylla* Lindley”, on 20/06/2013 and has been found to be satisfactory by the jury members.

Jury Members

Prof.Dr. Dilek KAZAN (Advisor)
Marmara University



Prof.Dr. Belma KIN ÖZBEK (Jury Member)
Yıldız Technical University



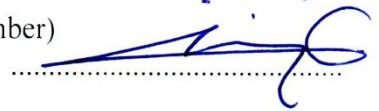
Prof.Dr. Sadık DİNÇER (Jury Member)
Cukurova University



Assoc. Prof.Dr.Berna SARIYAR AKBULUT (Jury Member)
Marmara University



Assoc. Prof.Dr. Gizem DİNLER DOĞANAY (Jury Member)
İstanbul Technical University



APPROVAL

Marmara University Institute for Graduate Studies in Pure and Applied Sciences Executive Committee approves that Hasan Ümit ÖZTÜRK be granted the degree of Doctor of Philosophy in Department of Chemistry, Biochemistry Program on _____ . (Resolution no: _____).

Director of the Institute

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın her aşamasında büyük emeği olan, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, yardımcı ve destek olan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Dilek KAZAN'a,

Her zaman tüm iyi niyetini ve bilgisini benimle paylaşan, her konuda bana destek olan Sayın Dr. Aziz Akın Denizci'ye

Bu tezin gerçekleşmesinde büyük emeği olan Sayın Prof.Dr. Ayşe OGAN'a

Tez çalışmalarım sırasında yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e

Deneysel çalışmalarımı gerçekleştirdiğim TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'ne

Doktora eğitimimi yaptığım Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne ve tez çalışmamı destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan destek veren Dr. Dilek COŞKUNER ÖZTÜRK, Dr. Güldem UTKAN, Nurçin Çelik ÖZTÜRK ve teknisyenimiz EMRAH VARDAR'a

Zor anlarda desteklerini hep hissettiğim arkadaşlarım Müge SERHATLI, Zelal ADIGÜZEL, Serkan UZYOL, Hüma UZYOL ve Bertan Koray BALCIOĞLU'na

Çalışmalarım süresince manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem Füsun ÖZTÜRK ve sevgili babam Yüksel ÖZTÜRK'e

Her zaman sabırla yanımda olan, sevgi ve desteklerini esirgemeyen, sevgili eşim Mukaddes ÖZTÜRK ve biricik kızım Duru ÖZTÜRK'e

Bu tezden kısa bir süre sonra dünyaya gelerek hayatımıza yeni bir neşe ve heyecan katacak oğlumuz Rüzgar ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----------|
| TEŞEKKÜR..... | i |
| İÇİNDEKİLER..... | ii |
| ÖZET | vi |
| ABSTRACT | vii |
| YENİLİK BEYANI | viii |
| SEMBOLLER..... | x |
| KISALTMALAR..... | xi |
| ŞEKİL LİSTESİ | xiii |
| TABLO LİSTESİ..... | xv |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1 Nişasta..... | 6 |
| 1.1.1 Nişastanın bileşenleri | 6 |
| 1.1.1.1 Amiloz | 7 |
| 1.1.1.2 Amilopektin..... | 8 |
| 1.1.1.3 Nişasta yapısında eser miktarda bulunan maddeler..... | 10 |
| 1.2. Glikosit Hidrolazlar | 10 |
| 1.2.1. Glikosit hidrolazların sınıflandırılması | 11 |
| 1.2.2. Glikosit hidrolazların katalitik mekanizması | 12 |
| 1.2.3. Domain Mimarisi | 14 |
| 1.3. α -amilase Enziminin Endüstriyel Uygulamaları | 19 |
| 1.3.1. Nişasta endüstrisi..... | 19 |
| 1.3.2. Deterjan endüstrisi..... | 21 |
| 1.3.3. Tekstil endüstrisi | 22 |
| 1.3.4. Kâğıt endüstrisi | 22 |
| 1.3.5. Ekmek ve fırıncılık endüstrisi | 23 |
| 1.3.6. Yakıt ve alkol üretimi..... | 24 |
| 1.4. Önceki Çalışmalar..... | 24 |
| 2. MATERYAL ve YÖNTEM..... | 29 |
| 2.1. Kimyasallar | 29 |
| 2.2. Besiyerleri..... | 29 |
| 2.3. SDP1 İzolatının Ürettiği Enzimlerin Belirlenmesi | 34 |
| 2.3.1. Katı ortamda enzim üretimlerinin belirlenmesi | 34 |
| 2.3.1.1. Amilaz üretimi..... | 34 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.3.1.2. | Selülaz üretimi..... | 34 |
| 2.3.1.2. | Ksilanaz üretimi..... | 35 |
| 2.3.1.3. | Proteaz üretimi..... | 35 |
| 2.3.1.4. | Fitaz üretimi..... | 35 |
| 2.3.2. | Sıvı ortamda amilaz üretiminin belirlenmesi | 35 |
| 2.3.2.1. | Amilaz enzim aktivitesinin belirlenmesi | 36 |
| 2.4. | Mikroorganizmanın Taksonomik Karakterizasyonu | 36 |
| 2.4.1. | Kültürel özelliklerin belirlenmesi..... | 37 |
| 2.4.2. | Mikroskopik özelliklerin belirlenmesi | 37 |
| 2.4.2.1. | Gram boyama | 37 |
| 2.4.2.2. | Endospor oluşumunun belirlenmesi | 37 |
| 2.4.3. | Fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi | 38 |
| 2.4.3.1. | Katalaz testi | 38 |
| 2.4.3.2. | Oksidaz testi | 38 |
| 2.4.3.3. | Farklı NaCl içeren ortamlarda büyümenin belirlenmesi | 39 |
| 2.4.3.4. | Maksimum ve minimum sıcaklıklarda büyümenin belirlenmesi | 39 |
| 2.4.3.5. | Farklı pH'larda büyümenin belirlenmesi..... | 39 |
| 2.4.3.6. | Bakterinin API sistemi ile tanılanması | 39 |
| 2.4.4. | Kemotaksonomik özelliklerin belirlenmesi | 44 |
| 2.4.4.1. | Hücre sel yağ asitlerinin analizi..... | 44 |
| 2.4.5. | Genotipik Özelliklerin belirlenmesi | 46 |
| 2.4.5.1. | Genomik DNA izolasyonu | 46 |
| 2.4.5.2. | Agaroz jel elektroforezi | 48 |
| 2.4.5.3. | 16s rDNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması .. | 48 |
| 2.4.5.4. | PZR için ürünlerin saflaştırılması..... | 49 |
| 2.4.5.5. | 16S rRNA gen dizisinin belirlenmesi..... | 50 |
| 2.4.5.6. | Filogenetik ağaçın oluşturulması..... | 52 |
| 2.4.5.7. | Guanin+sitozin (% G+C) oranının ve T _m değerinin belirlenmesi | 53 |
| 2.5. | Çalkalamalı Kültürde Enzim Üretim Koşullarının Optimizasyonu..... | 53 |
| 2.5.1. | Farklı karbon kaynaklarının SDP1 amilaz üretimi üzerine etkisi | 54 |
| 2.5.2. | Farklı azot kaynaklarının SDP1 amilaz üretimi üzerine etkisi..... | 54 |
| 2.5.3. | Sıcaklığın SDP1 α- amylase üretimi üzerine etkisi..... | 54 |
| 2.6. | SDP1 Amilaz Enziminin Karakterizasyonu..... | 55 |
| 2.6.1. | pH'nın enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi | 55 |
| 2.6.2. | Sıcaklığın enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi | 55 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.6.3. | Metallerin ve denature ajanların α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi | 55 |
| 2.6.4. | Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve zimogram analizi | 56 |
| 2.6.5. | İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile nişasta hidroliz ürünlerinin belirlenmesi | 58 |
| 2.6.6. | Amilaz enziminin LC/MS/MS ile belirlenmesi | 59 |
| 2.6.7. | Dairesel dikroizm spektroskopisi (CD)..... | 60 |
| 2.7. | SDP1 Amilazının Saflaştırılması | 61 |
| 2.7.1. | Ultrafiltrasyon ile örneklerin konsantre edilmesi..... | 61 |
| 2.7.2. | İyon-değişim kromatografisi | 62 |
| 2.7.3. | Amilaz enzim saflaştırmasında manyetit-aljinat kürelerinin kullanılması... 62 | |
| 2.7.3.1. | Demir manyetitlerin hazırlanması | 62 |
| 2.7.3.2. | Manyetik kalsiyum aljinat mikro kürelerinin hazırlanması..... | 63 |
| 2.7.3.3. | Amilazın manyetik aljinat mikrokürelerine bağlanması | 63 |
| 2.8. | Protein Miktarının Belirlenmesi | 64 |
| 3. | BULGULAR ve TARTIŞMA | 65 |
| 3.1. | Çukurova Bölgesinden İzole Edilen SDP1 İzolatının Ürettiği Enzimlerin..... | 65 |
| | Belirlenmesi..... | 65 |
| 3.1.1. | Katı besiyerinde SDP1 izolatının enzim üretiminin belirlenmesi..... | 65 |
| 3.1.1.1. | Amilaz üretiminin belirlenmesi | 65 |
| 3.1.1.2. | Selülaz üretiminin belirlenmesi | 65 |
| 3.1.1.3. | Ksilanaz üretiminin belirlenmesi..... | 66 |
| 3.1.1.4. | Katı besiyerinde fitaz üretiminin belirlenmesi | 67 |
| 3.1.2. | Sıvı besiyerinde enzim profillerinin belirlenmesi | 67 |
| 3.1.2.1. | Sıvı ortamda amilaz üretiminin incelenmesi | 68 |
| 3.2. | Mikroorganizmanın Taksonomik Karakterizasyonu | 68 |
| 3.2.1. | SDP1'in kültürel özellikleri | 68 |
| 3.2.2. | SDP1'in mikroskopik özellikleri..... | 69 |
| 3.2.3. | SDP1'in Fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri | 69 |
| 3.2.4. | Kemotaksonomik özellikler | 72 |
| 3.2.5. | SDP1 izolatının genotipik özellikleri | 73 |
| 3.2.5.1. | Genomik DNA izolasyonu | 73 |
| 3.2.5.2. | 16s rDNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması .. | 74 |
| 3.2.5.3. | 16S rRNA gen dizisinin belirlenmesi | 75 |
| 3.2.5.4. | Filogenetik ağacın oluşturulması..... | 76 |
| 3.2.5.5. | %G+C mol değerinin belirlenmesi | 77 |

| | |
|---|------------|
| 3.3. Çalkalamalı Kültürde <i>Bacillus subtilis</i> SDP'in Enzim retim Koşullarının Optimizasyonu | 78 |
| 3.3.1. Farklı karbon kaynaklarının SDP1 amilaz üretimi üzerine etkisi | 78 |
| 3.3.2. Farklı azot kaynaklarının SDP1 amilaz üretimi üzerine etkisi..... | 80 |
| 3.3.3. Sıcaklığın SDP1 α -amilaz üretimi üzerine etkisi | 82 |
| 3.4. <i>Bacillus subtilis</i> SDP1 amilaz enziminin karakterizasyonu | 82 |
| 3.4.1. pH'nın enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisi | 82 |
| 3.4.2. Sıcaklığın enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisi | 84 |
| 3.4.3. Metallerin ve denature ajanların α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkisi... | 86 |
| 3.4.4. Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve zimogram analizi | 88 |
| 3.4.5. İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile nişasta hidroliz ürünlerinin belirlenmesi | 88 |
| 3.4.6. Amilaz enziminin LC/MS/MS ile belirlenmesi | 91 |
| 3.4.7 Amilaz enziminin ikincil yapısının dairesel dikorizm spektroskopisi ile belirlenmesi | 93 |
| 3.5. <i>Bacillus subtilis</i> SDP1 α -amilaz enziminin saflaştırılması | 93 |
| 3.5.1. Amilaz enzim saflaştırmasında manyetit-aljinat kürelerinin kullanılması... | 95 |
| 4. SONUÇLAR..... | 99 |
| EKLER | 101 |
| KAYNAKLAR..... | 121 |
| ÖZGEÇMİŞ | 139 |

ÖZET

Akasya Ağacı Toprağından İzole Edilen *Bacillus* Sp. Tarafından Üretilen Endüstriyel Enzimlerin Araştırılması

Maltooligosakkarit üreticisi olan yeni bir α -amilaz üreticisi Akasya ağacı (*Acacia cyanophylla* Lindley) toprağından izole edilmiştir. Fiziksel karakteristiğine ve 16S rRNA gen sekansı bakıldığında izolatanın *Bacillus* genusuna ait olduğu belirlenmiş ve *Bacillus subtilis* SDP1 olarak adlandırılmıştır. En yüksek enzim üretimine çözülebilir nişatanın karbon kaynağı, maya özütünün de azot kaynağı olduğu besiyerinde ulaşılmıştır. SDP1 α -amilaz enzimi yaklaşık 61kDa'luk bir moleküler ağırlığa sahiptir. Enzimin optimum pH'sı 7.0 olmakla birlikte pH 5.0 ile pH 9.0 arasında oldukça aktiftir. Bununla birlikte pH 6.0 ile pH 8.0 arasında da çok kararlı bir enzimdir. Ham enzimin optimum sıcaklığı 60°C olup 50°C'de 1 ve 2 saatlik inkübasyonlar sonucunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla %83 ve %74'ünü korumaktadır. SDP1 α -amilaz enzimi DEAE-selüloz iyon değişirme kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucunda ham fermentasyon sıvısı yaklaşık % 26 verim ile 9,9 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin spesifik aktivitesi 191.8 U mg⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Manyetik alginat mikrokürelerine immobilize edilen SDP1 α -amilaz enziminin 70°C'deki termal kararlılığı yaklaşık 7 kat artmaktadır. Hem çözülebilir hem de buğday nişastanın SDP1 α -amilazı ile hidrolizi sonucunda ana ürün olarak maltoz, maltotrioz ve maltotetraoz olduğu ince tabaka kromatografisi ile belirlenmiştir. Bu da SDP1 α -amilaz enziminin maltooligosakkarit üreten bir enzim olduğunu göstermektedir. Aktivite ve stabilitesi için kalsiyuma ihtiyaç duymaması ve yeterli miktarda küçük maltotrioz ve maltotetraoz gibi küçük maltooligosakkaritler üretebilmesi SDP1 α -amilazını özellikle gıda ve fırıncılık sektörü için potansiyel bir aday yapmaktadır.

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEN-C-DRP-171108-0267 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Investigating Of Industrial Enzymes From *Bacillus Sp* Isolated From *Acacia Cyanophylla* Lindley

A maltooligosaccharide-forming α -amylase producer was isolated from the rhizosphere of *Acacia cyanophylla* Lindley from Çukurova region of Turkey. According to physiological characteristics and 16S rRNA gene sequence, this strain belonged to the genus *Bacillus* hence it was designated as *Bacillus subtilis* SDP1. Highest enzyme production was achieved with soluble starch as the carbon and yeast extract as the nitrogen source and at pH 7.0 and 37 °C. The α -amylase had an apperent molecular weight of 61 kD. The optimum pH of the enzyme was 7.0 and it was highly active at pH ranging from 5.0 to 9.0. It was also stable at pH ranging from 6.0 to 8.0. The optimum temperature of the crude enzyme was 60°C and it retained 83% and 74% of its initial activity after 1h and 2h incubation periods at 50°C. SDP1 α -amylase purified to homogeneity with single step ion-exchange chromatography. The purity of the enzyme was about 9.9-fold greater than that of the crude supernatant liquid. The yield of the purified enzyme preparation was about 26% with respect to the culture supernatant. The specific activity of the purified enzyme was about 191.8 U mg⁻¹. Immobilization of SDP1 α -amylase stability with magnetic alginate beads enhanced the enzyme stability ~7 fold at 70°C. The unique features of calcium independence and efficient production of small maltooligosaccharides such as maltotetraose and maltotriose make SDP1 amylase potentially useful in food industries.

This thesis has been supported by Marmara University, Scientific Research Project Unit with a project number FEN-C-DRP-171108-0267.

Haziran,2013

Hasan Ümit ÖZTÜRK

YENİLİK BEYANI

Akasya Ağacı Toprağından İzole Edilen *Bacillus Sp.* Tarafından Üretilen Endüstriyel Enzimlerin Araştırılması

Enzimler, endüstrinin birçok farklı uygulama alanında kendilerine yer bulmaktadır ve global enzim pazarı her yıl %6,8 oranında büyümektedir. Nişasta işleme, tekstil, kâğıt, fırıncılık ve pastacılık, alkol ve biodizel üretimi, sindirimi kolaylaştıran maddelerin hazırlanması, meyve sularının, tıbbi ilaçların üretimi gibi farklı endüstriyel uygulamalarda etkin olarak kullanılan α -amilazlar, enzim pazarı içerisinde büyük bir paya sahiptir.

Global yiyecek ve içecek enzimlerine duyulan talep son yıllarda dikkat çekici şekilde artmış ve 2010 yılında 1.220 milyon dolara kadar diğer bir deyişle tüm enzim pazarının %36,5'ine ulaşmıştır. 2020 yılında ise bu sektördeki enzim grubunun pazar payını 40,1'e yükselteceği ve piyasa değerinin de 2.520 milyon dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir.

Yiyecek ve içecek enzimleri içerisinde, özellikle fırıncılık sektöründe bayatlamayı geciktirici özelliğe ve orta termal kararlılığa (ITS) sahip amilazlara duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Doğada pek çok farklı özelliğe sahip amilaz ile ilgili çalışmalar bulunmasına rağmen, özellikle ITS ve küçük maltooligosakkarit (maltotrioz, maltotetroz) üretme yeteneğine sahip çok az amilaz rapor edilmiştir.

Bu tez kapsamında, akasya ağacı toprağından izole edilen ve *Bacillus SDP1* olarak adlandırılan izolatdan elde edilen maltooligosakkarit üreticisi α -amilaz enziminin üretim ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ilk bölümünde, gram pozitif endospor oluşturan izolat SDP1, moleküler ve konvansiyonel teknikler kullanılarak tanımlanmış ve mevcut literatürle karşılaştırılarak izolat SDP1 *Bacillus subtilis* olarak belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında, *Bacillus subtilis* SDP1 tarafından üretilen α -amilaz enziminin üretim optimizasyonu, saflaştırması, karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir ve bu çalışmalar mevcut literatür bilgileri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın üçüncü bölümünde ise α -amilaz enzimi için manyetik aljinat mikrokürelerinin kullanıldığı bir saflaştırma prosesi geliştirilmiştir. Ayrıca sentezlenen manyetik aljinat mikroküreleri ile α -amilaz

enziminin immobilizasyonu sağlanmış ve immobilize enzimin bağlanmamış enzime göre termal kararlılığının yaklaşık 7 kat arttığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada yeni izole edilen *Bacillus subtilis* suşu tarafından üretilen α -amilazın sahip olduğu kuk maltooligosakkarite hidrolizleme yeteneği özellikle gıda ve fırıncılık sektöründe istenen bir özellik olarak ortaya konmuştur. Literatürde rapor edilen amilazların büyük çoğunluğu aktivite ve yapısal kararlılıklarını koruyabilmek için Ca^{+2} gereksinim duyduklarından, reaksiyon ortamlarına bu metal iyonunun eklenmesine ihtiyaç duymaktadır. Ancak SDP1 α -amilaz enzimi aktivite veya stabilitesi için kalsiyum enzimine ihtiyaç duymaması ile de rapor edilen amilazlardan ayrılmaktadır. Bu özelliğe sahip çok az sayıda amilaz rapor edilmiştir.

Bu alışma sonucunda temel bilimsel çalışmalarla özgün bilgiler üretilerek uluslararası literatüre katkıda bulunacak nitelikte bilgi birikimi oluşturulması hedeflenmektedir.

Ayrıca yaklaşık tüm enzim ihtiyaını ithalat ile gerçekleştiren ülkemizde, özellikle fırıncılık sektöründe kullanılabilir bir amilaz enziminin üretimi, ekonomik olarak da katkı sağlayacaktır.

Haziran,2013

Prof.Dr. Dilek KAZAN

Hasan mit ÖZTÜRK

SEMBOLLER

| | |
|-------------|---|
| L | : litre |
| Gr | : gram |
| Mg | : miligram |
| µg | : Mikro gram |
| ml | : Mili litre |
| µl | : Mikro litre |
| M | : Molar |
| mM | : Mili molar |
| pmol | : piko mol |
| nm | : nano metre |
| rpm | : Santrifüj rotorunun dakikadaki devir hızı |
| °C | : Sıcaklık derece |
| m/z | : Kütle/yük |

KISALTMALAR

| | |
|----------------|---|
| TÜBİTAK | : Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu |
| GMBAE | : Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü |
| BAPKO | : Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu |
| pH | : Asitlik derecesi |
| DNA | : Deoksiribo nükleik asit |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| rRNA | : Ribozomal RNA |
| bç | : Baz çifti |
| His | : Histidin amino asiti |
| Asp | : Aspartik asit amino asiti |
| Ser | : Serin amino asiti |
| MOS | : Maltooligosakkaritler |
| GHazlar | : Glikosid hidrolazlar |
| G3 | : Maltotrioz |
| G4 | : Maltotetroz |
| G5 | : Maltopentoz |
| G6 | : Maltohekzoz |
| G7 | : Maltoheptoz |
| TSA | : Tripton Soya Agar |
| TSB | : Tripton Soya Broth |
| TE | : Tris-Etilen Diamin tetraasetik asit |
| TAE | : Tris-asetat tampon |
| dNTP | : Deoksiribonükleosid trifosfat |
| PZR | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| TEMED | : N,N,N',N'-Tetrametilentilendiamin |
| SDS | : Sodyum dodesil sülfat |
| PAGE | : Poliakrilamid jel elektroforezi |
| DEAE | : Dietilaminoetil |
| BSA | : Sığır serum albumini |
| PMSF | : Fenilmetilsülfonilflorür |
| TLC | : İnce Tabaka Kromatografisi |

| | |
|-------------|---------------------------------|
| PLGS | : Protein Lynx Global Server |
| SCX | : Katyon değişim kromatografisi |
| RP | : Ters-faz kromatografisi |
| DNS | : Dinitrosalisilik asit |

ŞEKİL LİSTESİ

| | SAYFA | |
|-------------|--|----|
| Şekil 1.1. | Amilozun yapısı a) α -D-glükoz birimlerinin birbirlerine α -1,4-glikozidik bağları bağlanması ile oluşan düz zincir yapısı | 8 |
| Şekil 1.2. | Amilopektinin yapısı | 9 |
| Şekil 1.3. | a)Amilopektinin temel özellikleri ve yapı meydana getiren farklı zincir yapıları | 10 |
| Şekil 1.4. | Niştanın hidrolizinde görev alan farklı enzimler. | 12 |
| Şekil 1.5. | Koshland [68] tarafından önerilen çifte yer değişim mekanizması | 13 |
| Şekil 1.6. | <i>Bacillus licheniformis</i> α -amilazın 3 boyutlu yapısı | 16 |
| Şekil 1.7. | Enzim-substrat kompleksinin üç boyutlu yapısına göre TAKA amilazın katalitik mekanizması | 18 |
| Şekil 2.1. | API 50CHB stripi | 41 |
| Şekil 2.2. | FAME analiz şeması | 45 |
| Şekil 2.3. | Agilent 6890C Network Gaz kromatografisi sistemi | 46 |
| Şekil 2.4. | Invitrogen Pure Link Genomic DNA kiti ve Nanodrop cihazı | 47 |
| Şekil 2.5. | Beckman Coulter CEQ 8800 genetik analiz sistemi ve kromatogram örneği | 52 |
| Şekil 2.6. | Manyetik Aljinat Mikroküreleri | 63 |
| Şekil 3.1. | İzolat SDP1'nin katı besiyerinde 72.saat amilaz aktivitesi | 65 |
| Şekil 3.2. | İzolat SDP1'nin katı besiyerinde 60.saat selülaz aktivitesi | 66 |
| Şekil 3.3. | İzolat SDP1'nin katı besiyerinde 60.saat ksilanaz aktivitesi | 67 |
| Şekil 3.4. | İzolat SDP1'nin katı besiyerinde fitaz aktivitesi | 67 |
| Şekil 3.5. | İzolat SDP1'in zamana karşı büyüme ve amilaz üretim grafiği | 68 |
| Şekil 3.6. | İzolat SDP1'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü | 69 |
| Şekil 3.7. | API test sonuçları | 72 |
| Şekil 3.8. | İzolat SDP1'a ait genomik DNA görüntüsü | 74 |
| Şekil 3.9. | İzolat SDP1'nin 16sRNA geni | 75 |
| Şekil 3.10. | İzolat SDP1'in neighbour-joining metodu kullanılarak çizilen filogenetik ağacı | 77 |
| Şekil 3.11. | Farklı karbon kaynaklarının SDP1 α -amilaz üretimine etkisi | 79 |
| Şekil 3.12. | Farklı azot kaynaklarının SDP1 α -amilaz üretimine etkisi | 81 |
| Şekil 3.13. | Organik azot kaynaklarının kombinasyonları ve maya özütünün farklı konsantrasyonlarının SDP1 α -amilaz üretimi üzerine etkisi | 81 |
| Şekil 3.14. | Sıcaklığın SDP1 α -amilaz üretimine etkisi | 82 |
| Şekil 3.15. | pH'nın SDP1 α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi | 83 |
| Şekil 3.16. | SDP1 α -amilazının pH kararlılığı | 84 |
| Şekil 3.17. | Sıcaklığın SDP1 α -amilazının aktivitesi üzerine etkisi | 85 |
| Şekil 3.18. | Farklı sıcaklıkların SDP1 amilazının termal kararlılığı üzerine etkisi | 86 |
| Şekil 3.19. | SDP1 α -amilazının SDS-PAGE ve zimogram görüntüleri | 88 |
| Şekil 3.20. | Çözülebilir niştanın ham SDP1 amilaz enzimi ile hidrolizi sonucu oluşan hidroliz ürünleri | 89 |
| Şekil 3.21. | Buğday niştanın ham SDP1 amilaz enzimi ile hidrolizi sonucu oluşan hidroliz ürünleri | 90 |
| Şekil 3.22. | Peptit karşılaştırma haritası | 92 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| Şekil 3.23. | SDP1 amilazının farklı pH değerlerindeki CD sonuçları | 93 |
| Şekil 3.24. | DEAE selüloz anyon değiştirici kromatografisi sonucu | 94 |
| Şekil 3.25. | Kolon çıktılarını %15 SDS-PAGE ve zimogram ile incelenmesi | 95 |
| Şekil 3.26. | Manyetik aljinat mikroküreleri ile yapılan saflaştırma çalışmasının SDS-PAGE ile kontrolü | 97 |

TABLO LİSTESİ

SAYFA

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Tablo 1.1. | Bazı mikrobiyal kaynaklı amilazların özellikleri | 3 |
| Tablo 1.2. | α -amilaz enzim ailesine ait bazı enzimlerin alan yapıları | 15 |
| Tablo 2.1. | API 50CHB Kiti içinde bulunan farklı karbohidratların listesi | 43 |
| Tablo 2.2. | API 20E Strip | 43 |
| Tablo 2.3. | 16s rDNA için PZR döngüsü | 49 |
| Tablo 2.4. | Dizileme reaksiyonu için kullanılan primerler | 50 |
| Tablo 2.5. | Dizileme reaksiyonu için PZR döngüsü | 51 |
| Tablo 3.1. | İzolat SDP1'nin ışık mikroskopunda yapılan ölçüm sonuçları | 69 |
| Tablo 3.2. | İzolat SDP1 ve referans soy <i>Bacillus subtilis</i> 10 ^T 'nin fenotipik özellikleri | 70 |
| Tablo 3.3. | İzolat SDP1 ve referans soy <i>Bacillus subtilis</i> 10 ^T 'nin karbohidrat kullanım profilleri | 71 |
| Tablo 3.4. | İzolat SDP1 ve referans soy <i>Bacillus subtilis</i> 10 ^T 'nin yağ asiti profilleri | 73 |
| Tablo 3.5. | İzolat SDP1'in %GC Mol değerleri | 78 |
| Tablo 3.6. | Metallerin, denatüre ajanların ve enzim inhibitörlerinin enzim aktivitesi üzerine etkisi | 87 |
| Tablo 3.7. | LC/MS/MS analizi | 91 |
| Tablo 3.8. | Katalaz enzimi için LC/MS/MS sonucu | 92 |
| Tablo 3.9. | SDP1 α -amilazın saflaştırma tablosu | 94 |
| Tablo 3.10. | Manyetit aljinat küreleri kullanılarak yapılan saflaştırma tablosu | 97 |
| Tablo 4.1. | Maltooligosakkarit üreticilerinin karşılaştırılması | 100 |

1. GİRİŞ

Enzim kullanımı, enzimlerin kimyasal yapıları ve reaksiyonları katalizleme yeteneklerinin bilinmesinden çok daha eskilere dayanmaktadır. Buna karşın tamamen enzimatik olan ilk endüstriyel proses olan nişasta işleme prosesi ancak 1960 yılında geliştirilmiştir [1].

Enzim uygulamaları, endüstriyel mikrobiyoloji ve biyokimyasal mühendisliklerde kaydedilen gelişmelere paralel olarak, ikinci dünya savaşından sonra artış göstermeye başlamıştır [1]. Günümüzde enzimler, gıda, yem, deterjan, tekstil, deri, kuru temizleme, ilaç, kozmetik, kâğıt ve hassas kimyasalların üretimi gibi birçok farklı alanda kullanım alanı bulmuşlardır. Enzimlerin küresel pazarının % 80'ini, endüstriyel uygulamalar oluşturmaktadır [2]. Bunlar içinde gıda ve deterjan sektöründe kullanılan enzimler enzim pazarında ki en büyük paya sahiptirler.

Novozymes S/A tarafından 2011 yılında yayınlanan raporda, endüstriyel enzim pazarının büyük üreticilerinden olan Novozymes S/A, DuPont ve DSM'in sırasıyla bu pazarın %47, %21 ve % 6 'sına sahip oldukları belirtilmiştir [3].

Global enzim pazarının her yıl % 6.8 oranında büyümesi öngörülmektedir. Global yiyecek ve içecek enzimlerine duyulan talep son yıllarda dikkat çekici şekilde artmış ve 2010 yılında 1.220 milyon dolara ve tüm enzim pazarının %36.5'ine ulaşmıştır. 2020 yılında ise bu sektördeki enzim grubunun pazar payını 40.1'e yükselteceği ve piyasa değerinin de 2.520 milyon dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir [4]

Bilinen en eski ve en önemli endüstriyel enzimlerden olan amilazların tarihçesi ilk olarak 1811 yılında nişasta parçalayan enzimin Kirchoff tarafından keşfi ile başlamıştır [4]. Amilazlar nişasta moleküllerini dekstrinler ve glikoz birimlerinden oluşan daha küçük polimerlere indirgeyen hidrolitik enzimlerden oluşur. α -amilazlar nişasta işleme, tekstil, kâğıt, fırıncılık ve pastacılık, alkol ve biodizel üretimi, sindirimi kolaylaştıran maddelerin hazırlanması, meyve sularının, tıbbi ilaçların üretimi gibi farklı endüstriyel uygulamalara da sahiptirler [4, 5]. Endüstriyel enzimlerin bu sınıfı enzim pazarının yaklaşık 25%'ini oluşturmaktadır [6].

Amilazlar, en basit şekli ile endoamilazlar ve ekzoamilazlar olarak iki kategoriye ayrılırlar. Endoamilazlar α -amilazlar (EC 3.2.1.1, 1,4- α -D-glucan glucanohydrolase) glikozil hidrolaz ailesi 13 içinde sınıflandırılırlar. α -amilazlar nişastanın hidrolizini düz zincir içindeki bitişik glikoz üniteleri arasında bulunan, 1,4- α -D- glikozit bağlarını rastgele keserek, α -anomerik ürünlerin oluşmasına sebep olarak gerçekleştirirler [7]. Ekzoamilazlar (β -amilazlar ve glucoamilazlar) ise nişastayı indirgenmemiş ucundan hidrolizlerler.

Amilazlar doğada hayvan, bitki ve mikrobiyal birçok farklı kaynaklardan elde edilebilmektedir. Birbirinden çok farklı optimum pH, sıcaklık, moleküler büyüklük ve kararlılığa sahip amilazlar, literatürde rapor edilmiş olmasına rağmen, endüstriyel öneme bakıldığında fungal ve bakteriyel kaynaklı amilazların özellikle de *Bacillus* türüne ait organizmalardan elde edilenlerin amilazların daha fazla ve farklı uygulama alanları bulunduğu görülmektedir [4, 6, 8]. Endüstriyel amaçlar için kullanılan mikrobiyal α -amilazlar başlıca *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Aspergillus oryzae*'den üretilmiştir [9]. Karakterize edilen fungal ve bakteriyel kaynaklı bazı amilaz üreticileri ve özellikleri Tablo 1.1'de verilmiştir. Çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere ihtiyaç duyulan gelişmiş, farklı ve yeni özelliklere (spesifisite, kararlılık, sıcaklık, metal iyon ve pH bağımlılığı) sahip yeni amilaz üreticilerinin bulunması için de giderek artan bir ilgi bulunmaktadır [10, 11].

Tablo 1.1. Bazı mikrobiyal kaynaklı amilazların özellikleri

| Kaynak | Molekül Ağırlığı | pH Optimum/Kararlılık | Sıcaklık Optimum/Kararlılık | İnhibitörler | Referans# |
|--|------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---|-----------|
| Bakteri | | | | | |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | - | 7.0 | 33 °C | - | [12] |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | 22.5 | 9.0/6.0-11.0 | 76 °C /60 °C | - | [13] |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | 28.0 | 9.0/7.0- 9.0 | 90 °C /60 °C (3 s), | Hg ⁺² , Cu ⁺² , Ni ⁺² , Zn ⁺² ,Ag ⁺² | [14] |
| <i>Bacillus licheniformis NCIB 6346</i> | 62- 65 | 7.0/7.0-10.0 | 70- 90 °C /85 °C (1s) | - | [15] |
| <i>Bacillus sp. I-3</i> | - | 7.0 | 70°C | EDTA, HgCl ₂ | [16] |
| <i>Bacillus sp. PS-7</i> | 71.0 | 6.5 | 60°C | - | [17] |
| <i>Bacillus subtilis JS-2004</i> | - | 7.0 | 50°C | Co ⁺² , Cu ⁺² , Hg ⁺² Mg ⁺² , Zn ⁺² ,Ni ⁺² , Fe ⁺² , ve Mn ⁺² | [18] |
| <i>Bacillus sp. Ferdowsicous</i> | 53.0 | 4.5 | 70°C | Hg ⁺² , Zn ⁺² ve EDTA | [19] |
| <i>Bacillus sp. KR-8104</i> | 59.0 | 4.0 - 6.0 | 70-75 °C | - | [20] |
| <i>Bacillus dipsosauri DD1</i> | 80.0 | 6.1 | 60 °C | Zn ⁺² ve Cd ⁺² | [21] |
| <i>Lactobacillus manihotivorans LMG 18010T</i> | 135.0 | 5.5 | 55 °C | Ni ⁺² , Cu ⁺² , Hg ⁺² , Fe ⁺² ve Al ⁺³ | [22] |
| <i>Bacillus stearothermophilus ATCC 12980</i> | 59.0 | 5.0- 6.0/6.0-7.5 (1s, 80 °C) | 70- 80 °C /(5 gün) 90 °C (45 dak) | Cd ⁺² , Cu ⁺² , Hg ⁺² , Pb ⁺² , Zn ⁺² ,6 M üre ile | [23] |
| <i>Bacillus subtilis 65</i> | 68.0 | 6.0/6.0- 9.0 | 60 °C /60 °C (5dak) | Cu ⁺² , Fe ⁺³ , Mn ⁺² , EDTA Zn ⁺² ,Pb ⁺² , Al ⁺³ , Cd ⁺² ,Ag ⁺² , | [24] |
| <i>Escherichia coli</i> | 48.0 | 6.5/<7.0 | 50 °C /<70 °C | Hg ⁺² , Fe ⁺³ , Al ⁺³ | [25] |
| <i>Streptococcus bovis JBI</i> | 77.0 | 5.0- 6.0/5.5- 8.5 | 50 °C (1 s) | Hg ⁺² , p-kloromerküribenzoik | [26] |

| | | | | | |
|---|-------|---|--------------------------------------|--|------|
| <i>Micromonospora melanosporea</i> | 45.0 | 7.0 | 55 °C/40 °C (pH11/ 12, 40 dak) | - | [27] |
| <i>Thermomonospora profundus</i> DT5432 | 42.0 | 5.5- 6.0/5.9- 9.8 | 80 °C/80 °C (3 h), 90 °C (15 dak) | Iodoasetic asid, N-bromosüksinik asit, SDS, | [28] |
| Mantar ve maya | | | | | |
| <i>Aspergillus awamori</i> ATCC 22342 | 54.0 | 4.8-5.0/3.5-6.5 (24 h) | 50 °C/40 °C (60 dak) | Hg ⁺² , Pb ⁺² , maltoz | [29] |
| <i>Aspergillus niger</i> van Tieghem CFTRI 1105 | 56.2 | 5.0; 6.0/5.2- /6.0 (- Ca); 5.8- 7.0(- Ca) | 60 °C/65 °C (10dak) | Ag-, Al ⁺³ , Cu ⁺² , Hg ⁺² , Pb ⁺² , Zn ⁺² , EDTA | [30] |
| <i>Aspergillus niger</i> | - | 5.5 | 70 °C | - | [31] |
| <i>Aspergillus niger</i> UO-1 | - | 4.95 | 50 °C | Cu ⁺² , Hg ⁺² ve Zn ⁺² | [32] |
| <i>Aspergillus oryzae</i> CBS570.64 | - | 7.0 | 35 °C | - | [33] |
| <i>Aspergillus kawachii</i> | 108.0 | 3.0 | 30 °C | - | [34] |
| <i>Cryptococcus flavus</i> | 75.0 | 5.5 | 50 °C | Hg ⁺² , Fe ⁺² ve Cu ⁺² | [35] |
| <i>Pycnopus sanguineus</i> | - | 7.0 | 37 °C | Glukoz ve maltoz | [36] |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 54.1 | 5.0 | 50 °C | - | [37] |
| <i>Aspergillus oryzae</i> M13 | 52.0 | 5.4/5.0- 9.0 | 50 °C | - | [38] |

α -amilazların endüstriyel olarak kullanıldığı alanlardan biri de fırıncılık sektörüdür. Fırıncılık sektöründe α -amilazlar, ekmek hamuruna katılarak, unun içindeki nişastayı dekstrinlere parçalayıp, maya tarafından daha rahat fermente edilebilir forma getirirler. Bunun dışında çeşitli α -amilazlar tarafından üretilen maltooligosakkarit (MOS)'ler kaplama maddesi, viskozite sağlayıcısı, lezzet taşıyıcısı ve kristalizasyon inhibitörü olarak kullanılmaktadırlar. MOS'ların, ekmek içinin sertleşme hızını azaltarak, bayatlama geciktirici ajanlar olarak hareket ettikleri de rapor edilmiştir. Duran ve ark., (2001) özellikle maltotrioz (G3) den maltopentaoz (G5) aralığında değişen maltooligosakkaritlerin ekmeğin bayatlamasını geciktirdiğini, raf ömrünü uzattığı (2-3 gün), kırıntı oluşumunu azalttığını ve hamurun yapısını iyileştirici bir ajan olarak görev yaptığını belirtmişlerdir [39]. Bu özellik ekmeğin raf ömrünü uzatması sebebi ile ekonomik olarak da çok önemlidir. Sadece Amerika da her yıl bayatlayan ekmeklerin atılması sebebi ile 1 milyar dolarlık maddi kayıp yaşanmaktadır. Bayatlama geciktirici özelliğe sahip α -amilazlar, genellikle orta dereceli termal kararlılığa (ITS) sahip amilazlardır.

Bu özelliklerinden ötürü özellikle fırıncılık sektöründe kullanılmak üzere küçük maltooligosakkaritleri oluşturabilme yeteneğine sahip yeni amilaz üreticilerinin bulunması konusunda artan bir ilgi bulunmaktadır [40]. Spesifik olarak büyük DP 5-7 arasında değişen büyüklükte MOS üreten *Bacillus* amilazlar rapor edilmiştir. Bunlar maltoheptaoz (G7) oluşturan *Bacillus subtilis* US116 amilazı [41], maltoheksoz (G6) oluşturan *Bacillus halodrans* LBK amilazı [42] ve *Bacillus stearothermophilus* US100 amilazı [43], maltopentoz oluşturan *Bacillus circulans* [15] amilazıdır. Ancak küçük MOS (DP 3-4) oluşturan az sayıda amilaz üreticisi rapor edilmiştir. Bunlar maltotetraoz (G4) oluşturan *Bacillus* suşu GM8901 [44] ve maltotriose oluşturan *Bacillus subtilis* [45] amilazlarıdır. Son yıllarda G3 ve G4 oluşturan yeni mikroorganizmalarda rapor edilmektedir.

Maltooligosakkarit (G3-G4) oluşturma yeteneğine sahip bir amilaz üreticisi olduğu belirlenen izolat SDP1'in moleküler ve konvansiyonel yöntemler ile tanılanması, α -amilaz enzim üretim süreçlerinin ve teknolojilerin geliştirilmesi, optimize edilmesi, üretilen enzimin karakterize edilmesi bu tez çalışmasının amacını oluşturmaktadır.

1.1 Nişasta

Nişasta soğuk suda çözünmeyen granüller formda, organizmalar için depo maddesi olarak bitki hücrelerinde depolanan önemli bir karbohidrattır. Nişasta patates, buğday, pirinç, mısır, tapyoka gibi birçok ekonomik önemi olan ürünün ana bileşenidir [46, 47].

Nişasta bitkilerde glikozun depo şeklidir. Bitkiler glikozu, güneş ışığını kimyasal enerjiye dönüştürdükleri fotosentez reaksiyonu sonucunda üretirler. Nişasta, bitkilerin gece solunumunda kullanması için depo bileşiği olarak yapraklarda bulunan plastidlerde sentezlenmektedir. Ayrıca uzun dönem depolama bileşiği olarak da yumrular, köklerde ve tohumlarda bulunan amiloplastidlerin içinde sentezlenirler. Daha sonra büyük miktarda sentezlenen nişasta bu organellerde suda çözünmeyen granüller bir form alır ve birikir. Granüllerinin yapısı, şekli ve büyüklükleri bitkilerin türlerine göre farklılık göstermektedir. Örneğin, ticari olarak ilgi duyulan nişasta kaynaklarından; mısır nişastasında granül boyutları (2-30) µm arasında değişirken patates nişastasında bu granüller (5-100) µm boyutlarında olabilmektedirler [47, 48].

1.1.1 Nişastanın bileşenleri

Nişasta, molekül ağırlığı 50.000 ile 1.000.000 dalton arasında değişen büyük bir glikoz polimeridir. Bu polimer glikoz moleküllerinin birbirlerine C1 oksijeninden bağlanması ile diğer bir deyiş ile aralarında glikozit bağı oluşturmaları ile oluşmaktadır. Oluşan glikozit bağı, yüksek pH da kararlı iken düşük pH değerlerinde hidrolize olmaktadır. Eskiden endüstride enzim kullanımı yaygınlaşmadan önce bu bilgiden faydalanılarak nişasta asit hidrolizi yöntemi ile parçalanırdı. Nişasta'nın polimerik zincirinin sonunda indirgen uç olarak adlandırılan durağan bir aldehit grubu bulunmaktadır.

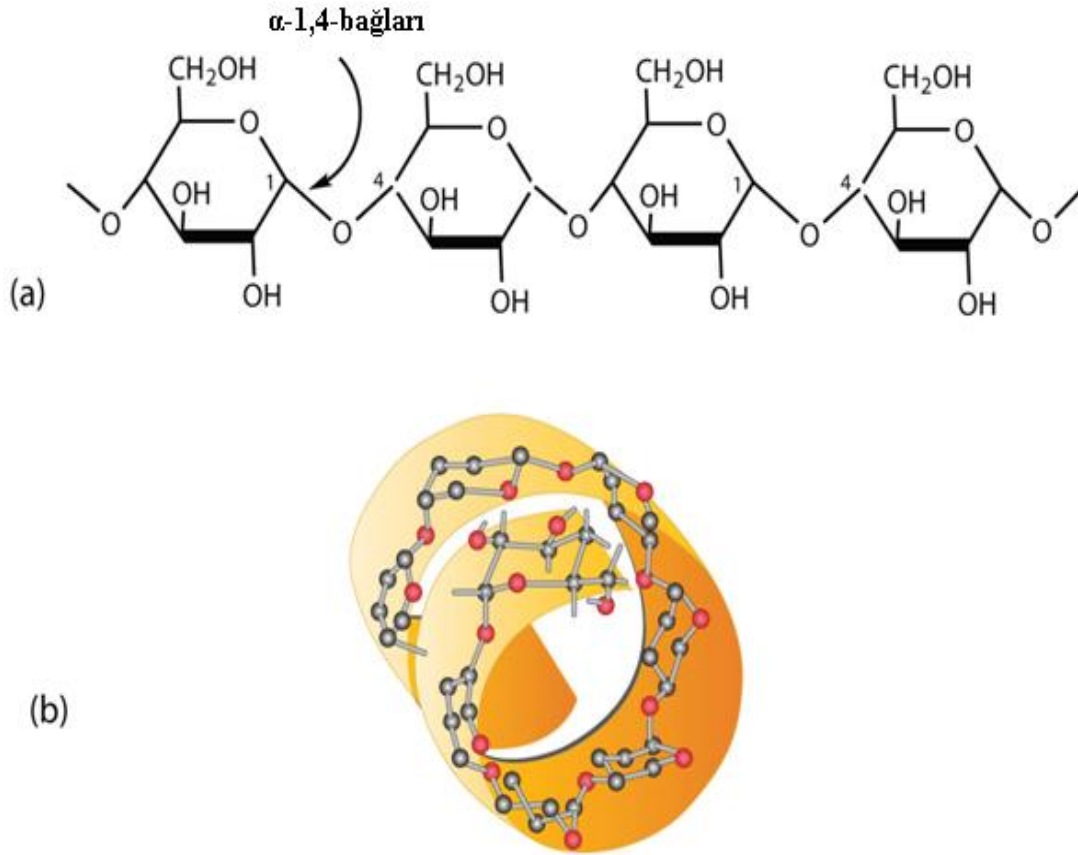
Nişasta, amiloz ve amilopektin adı verilen iki glikoz polimerinin yarı – kristalin granüller yapı içerisinde farklı oranlarda birleşmesinden meydana gelmektedir. Farklı bitki türlerinde, hatta aynı türün farklı çeşitlerinde bile (kültivar) amilozun amilopektine oranı değişiklik göstermektedir. Örneğin, buğday nişastasını yaklaşık % 25 amiloz içerirken, mısır nişastasını % 97-99 oranında amilopektine sahiptir. [49-51]

1.1.1.1 Amiloz

Amiloz, glikoz birimlerinin α -1,4 bağları ile uç uca eklenmesi ile oluşan ve çok az sayıda α -1,6 bağlantısı içeren lineer yapıda polimerik bir karbohidrattır (Şekil 1.1a.) [52].

Amiloz, lineer bir polimer olmasına karşın birbirlerine α -1,4 bağı ile bağlanan glikoz birimlerinin açılı olma eğiliminden dolayı amiloza doğal bir büküm vererek ona sarmal bir konformasyon kazandırmaktadır. Ayrıca, iki amiloz molekülü de birbirine sarılarak çift sarmal bir yapı oluştururlar (Şekil 1.1b.). Bu sarmalın iç yüzeyi hidrofobik olduğu için içinde yer alan su molekülleri kolaylıkla bağlar, alkoller ve iyot gibi daha hidrofobik moleküllerle yer değiştirebilir. Nişastayı test etmek için kullanılan iyot molekülleri amiloz sarmallarının içine dizilince mavi bir renk oluşur. Bunun sebebi, amiloz içinde çok az su barındıran yoğun bir yapıya sahip olması ve amiloz sarmalları arasında oluşan hidrojen bağlarıdır [53].

Amilozun yapısında, 500-6000 glikoz birimi bulunmakta ve bu birimlerin sayısı polimerizasyon derecesini (DP) belirlemektedir. DP türler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Örneğin, pirinç, mısır ve buğday nişastasında bulunan amiloz sırasıyla 1.110, 960 ve 1.290 gibi benzer DP değerlerine sahipken, patates ve tapyoka da amilozlar sırasıyla 2,660 ve 4,920 gibi daha yüksek DP değerlerine sahiptir [54]. Amilozun molekül ağırlıkları da farklı botanik orijinler hatta aynı bitkinin farklı çeşitleri arasında bile büyük farklılıklar göstermekte ve 80.000 ile 320.000 arasında değişmektedir [55].

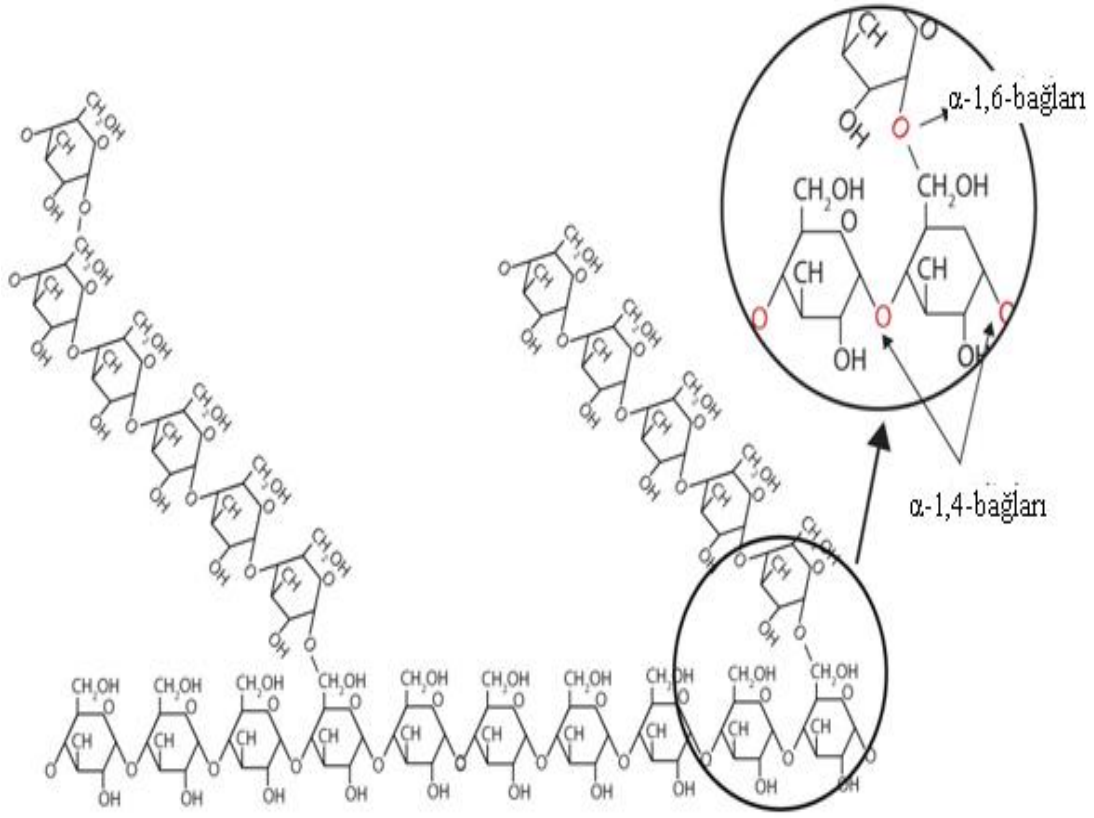


Şekil 1.1. Amilozun yapısı a) α -D-glükoz birimlerinin birbirlerine α -1,4-glikozidik bağları bağlanması ile oluşan düz zincir yapısı b) Hidrojen bağları yardımı ile oluşan sarmal yapı [56]

1.1.1.2 Amilopektin

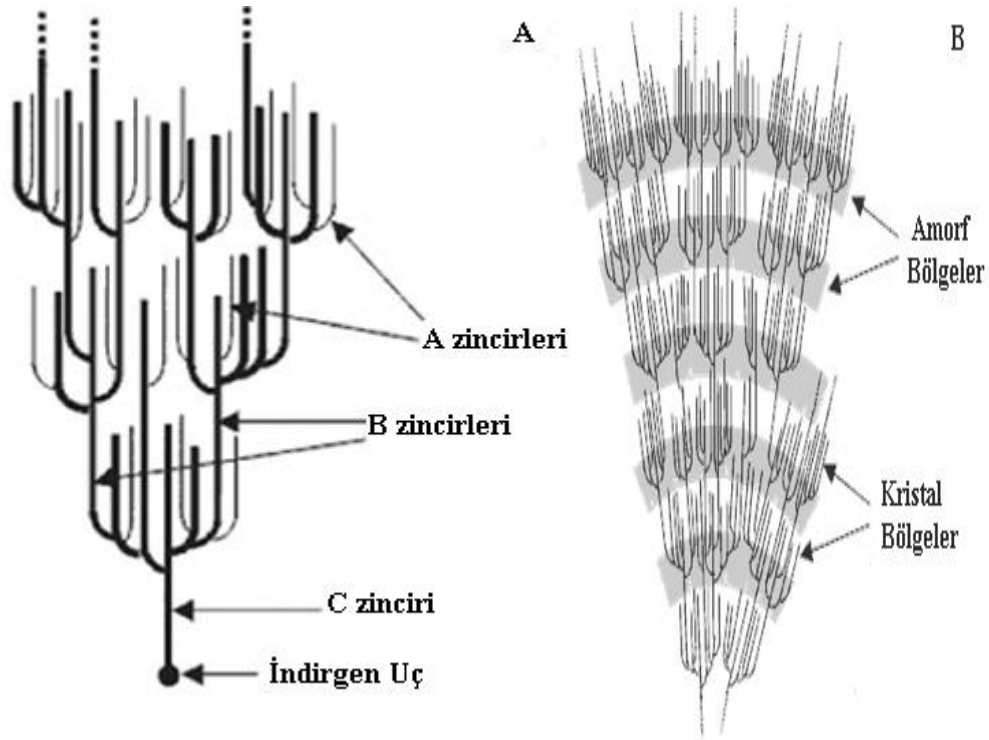
Amilopektin nişastanın ana bileşenidir. Amilopektin D-glikoz moleküllerinin α -1,4 bağlantısına ek olarak α -1,6-glikozidik bağları ile dallanması ile oluşan doğadaki en büyük polimerdir (Şekil 1.2.) [57].

Amilopektinin yapısı, merkezden dallanarak genişleyen bir çalı gibidir. Toplamda 2.000 ile 200.000 arasında, D-glikoz biriminin bir araya gelmesi ile oluşan amilopektin polimerinde düzenli olarak her 24-30 glikoz molekülünden sonra α -1,6 bağlantılarıyla dallanma meydana gelir. α -1,6 bağları, toplam glikozidik bağların % 4-5'ini içermektedir. Dallanma noktalarında molekül düzensizdir, iki dallanma noktası arasında ise çifte sarmallar düzgün bir şekilde istiflenerek kristal bir yapı oluştururlar.



Şekil 1.2. Amilopektinin yapısı [56]

Amilopektin sarmallarının tahıllarda ki gibi sıkı, patates muz gibi bitkilerde ise daha aralıklı istiflenmesi sebebi ile sırasıyla A ve B tipi nişastalar meydana gelmektedir. A-tipi nişasta kırılmamış 23-29 glikoz altbiriminden oluşurken B-tipi nişasta da ise daha uzun 30-44 glikoz altbiriminden meydana gelmektedir. Ayrıca mikroskopta incelendiğinde, düzenli ve düzensiz bölgeler büyüme halkaları gibi gözükmemektedir (Şekil 1.3.). Benzer yapıda bir polimer olan ve amilopektinin hayvanlardaki glikozun depo formu olan glikojen ile arasındaki en büyük fark glikojende daha çok dallanma olması ve her bir dalın 8-12 arasında glikoz birimi içermesidir.



Şekil 1.3. a)Amilopektinin temel özellikleri ve yapı meydana getiren farklı zincir yapıları, b) Amorf ve kristaline bölgeler [58]

1.1.1.3 Nişasta yapısında eser miktarda bulunan maddeler

Nişastanın %1'lik bölümünü oluşturan maddeler nişastanın fonksiyonunu da etkileyen lipid ve proteinlerdir [59]. Lipidler genellikle tahıl nişastalarının yapısında bulunurlar. Tahıl nişastalarında bulunan amilozun %15 ile %55 e kadar değişen miktarları nişasta granülünde bulunan yağ asitleri ile birleşerek inklüzyon cisimcikleri meydana getirirler. Nişasta granülünün içinde bulunan proteinin büyük bölümünü depo proteinleri olan gliadin ve glutaminler oluşturur. Bunun dışında nişasta sentezinden sorumlu enzimler ile birlikte nişasta parçalayıcı enzimlerde nişasta granülleri içinde sıkışmışlardır. Nişasta granülleri az miktarda da olsa (%0.4) fosfor, kalsiyum, magnezyum, potasyum ve sodyum gibi mineralleride içermektedir. Özellikle fosfor nişastanın yapısında bulunan fosfolipidlerin içinde bulunduğundan nişastanın fonksiyonel özelliklerine de etki etmektedir [60].

1.2. Glikosit Hidrolazlar

Glikosit hidrolazlar (GHazlar) (EC 3.2.1.-) iki veya daha fazla karbohidrat arasında veya bir karbohidrat ve bir non-karbohidrat molekül arasında bulunan

glikosidik bağı hidrolize eden enzimlerdir. Doğa da çok yaygın olarak bulunmaktadır. Glikosid hidrolazlar ailesine mensup olan amilazlar ise spesifik olarak nişasta polimeri ve onun türevleri üzerinde etki göstererek onları dekstrin ve glikoz birimlerine hidrolizlerler. Amilazlar en eski ve çok farklı uygulama alanına sahip çok önemli endüstriyel enzim grubudur [4, 5].

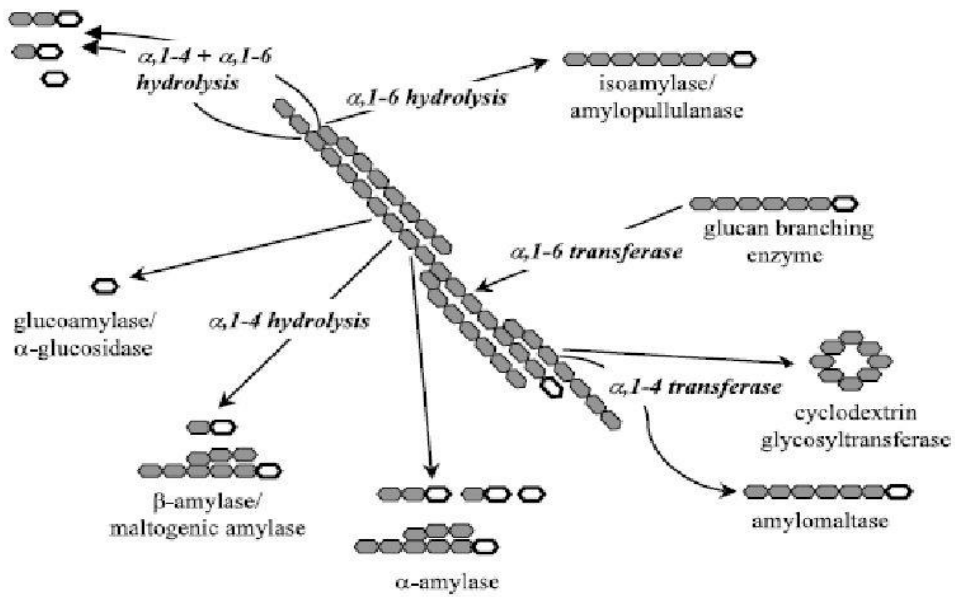
1.2.1. Glikosid hidrolazların sınıflandırılması

GHazlar için önerilen en basit sınıflandırmalardan biri, substrat özgüllüğüne dayalı olan sınıflandırma biçimidir. Bu sistemde, her bir enzim Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği tarafından önerilen enzim sınıflandırma numarası (EC) ile karakterize edilir. GHazlar'lar genel olarak substrat özgüllüklerine, bazı durumlarda ise moleküler mekanizmalarına göre EC 3.2.1.x kodu ile karakterize edilmektedirler. Örnek olarak α -amilaz EC 3.2.1.1; β -amilaz 3.2.1.2; glukoamilaz ise 3.2.1.3 ile sınıflandırılırlar. Ancak bu sınıflandırma sisteminde enzimlerin yapısal özellikleri yansıtılmamaktadır.

Diğer bir sınıflandırma şeklinde ise GHazlar'lar polisakkaritin hangi bölgesine atak ettiğine göre (i) endo (ii) egzo (iii) debranching enzimler ve (iv) transferazlar olarak 4 temel gruba ayrılırlar. Endoamilazlar, amiloz veya amilopektin zincirlerinin iç tarafında bulunan α -1,4 glikosidik bağlarını hidrolize ederken, ekzoamilazlar glukoz polimerlerinin redüklenmemiş uçunda bulunan maltozun anomerik konfigürasyonu değiştirerek koparılmasını sağlar [61]. Debranching enzimleri özellikle α -1,6 glikosidik bağlarını hidrolize ederler. Transferazlar ise donör molekülün α -1,4 glikosidik bağlarını kırarak donörün bir kısmını yeni bir glikosidik bağ yaparak glikosidik alıcıya transfer eder. Ancak bu sınıflandırma da özellikle ara davranış gösteren enzimlerin sınıflandırması için çok uygun değildir [62].

Amino asit sekansları bir protein hakkında önemli yapısal ve mekanistik bilgiler içerdiğinden enzimleri amino asit sekans homolojilerine ve yapısal benzerliklerine göre ailelere ayırmak ise muhtemelen en güçlü ve yaygın olarak kullanılan bir sınıflandırma biçimidir [62]. Bu sınıflandırma yöntemi ile enzimlerin yapısal özellikleri, diğer enzimler ile olan evrimsel benzerlikleri, mekanik özellikleri ve substrat özgüllükleri hakkında bilgi edinebilmektedir.

Karbohidrat-Aktif Enzim (Carbohydrate-Active Enzyme) veribankası (<http://www.cazy.org>) düzenli olarak GHaz aileleri hakkında güncel listeleri sağlamaktadır. Buna göre veri bankasında 131 tane GHazlar ailesi bulunmaktadır. Nişastayı parçalayan enzimler genel olarak GHaz ailesi 13 içinde sınıflandırılmışlardır. Bununla birlikte 14. ve 15. ailelerde sırasıyla β -amilaz ve glukoamilazlar sınıflandırılmışlardır [63-65]. Enzim ailelerinin daha büyük gruplar içinde sınıflandırılmaları sonucu klanlar oluşmaktadır [66]. Klan, benzer üç boyutlu yapıya, katalitik altbirimlere ve mekanizmaya sahip ailelerin oluşturduğu büyük gruplardır. Klan'a dâhil olan ailelerin ortak bir evrimsel soydan geldikleri düşünülmektedir. Bu sınıflandırmaya göre de 13, 70 ve 77 numaralı aileler yapısal ve fonksiyonel olarak ilişkili olan enzimleri içermektedir ve aynı klan içinde gösterilmişlerdir [58]. Nişastanın hidrolizinde görev alan farklı enzimler ve etki bölgeleri Şekil 1.4.'de gösterilmiştir.

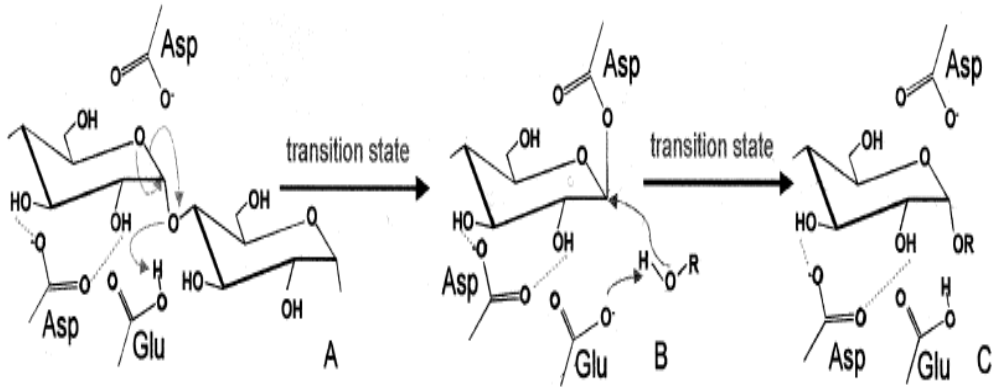


Şekil 1.4. Nişastanın hidrolizinde görev alan farklı enzimler. (Poliglukoz molekülünün indirgen ucu açık halka şeklinde gösterilmiştir) [67].

1.2.2. Glikosit hidrolazların katalitik mekanizması

GHaz aile 13'e, diğer adı ile α -amilaz ailesine mensup tüm enzimlerin benzer bir aksiyon mekanizmasına sahip olduklarına inanılmaktadır. Bunun sebebi bu enzimlerin hepsinin katalitik bölgesinde yer alan amino asit altbirimlerinin ortak ve korunmuş olmasıdır [8]. α -amilazların enzim aktiviteleri esnasında anomerik yapı korunmaktadır. Başka bir deyişle enzim substratı ürüne dönüştürürken substratın α -

bağları üzerinde etki göstermekte ve α -bağlı ürünler meydana gelmektedir. Bu reaksiyonun Koshland (1953) tarafından ortaya sürülen çifte yer değişim mekanizması ile gerçekleştiğine inanılmaktadır (Şekil 1.5.). Glikosilasyon olarak da bilinen birinci yer değişim reaksiyonunda, enzim üzerindeki asit grup, glikosidik oksijeni protonlayarak C1-O bağının kırılmasına sebep olarak oksokarbenium-iyon-benzeri geçiş safhasının oluşmasına sebep olur. Proteinin nükleofilik grubu, şekerin anomerik merkezine atak yaparak, β -glikozit nükleofilik ara formunun oluşmasına sebep olurken bu sırada substrat'ın aglikonu aktif bölgeyi terk eder. Hidrolizin deglikosilasyon olarak da bilinen ikinci aşaması, karboksilat formunda bulunan önceki proton vericisi tarafından aktive edilen su molekülünün, anomerik merkeze olan atağı ile tanımlanan bir geri dönüşümdür. Reaksiyonun bu ikinci aşaması da daha önce olduğu iyon-benzeri geçiş safhası gibi gerçekleşmektedir. Reaksiyon, α -anomerik konfigürasyona sahip ürün ile orijinal asit grubunun tekrar protonlanması ile son bulur. İkinci yer değiştirme esnasında, anomerik merkeze, su yerine şeker altbiriminin serbest hidroksil grubunun atak yapması durumuna ise transglikosilasyon meydana gelir [8, 67].



Şekil 1.5. Koshland [68] tarafından önerilen çifte yer değişim mekanizması

Koshland [68], çift yerdeğiştirme mekanizması sırasında üç tane korunmuş katalitik rezidüden sadece iki tanesinin direk olarak rol aldığı göstermiştir. Bunlar birbirlerine 5.5 Å uzaklıkta yer alan glutamat ve aspartat altbirimleridir. Katalitik bölgede korunan üçüncü altbirim olan ikinci aspartat, substratın OH-2 ve OH-3 gruplarına bağlanarak substratın distorsiyonunda rol almaktadır. Diğer korunmuş amino asit rezidüleri histidin, arjinin ve tirozindir. Bu rezidülerin görevleri substratın

doğru yönlenmesi ile aktif bölge içinde pozisyon almasını, nukleofilin uygun oryantasyonunun sağlanması, geçiş safhasının stabilizasyonu ve substratın elektronik yapısının polarizasyonunu sağlamaktır [69].

1.2.3. Domain Mimarisi

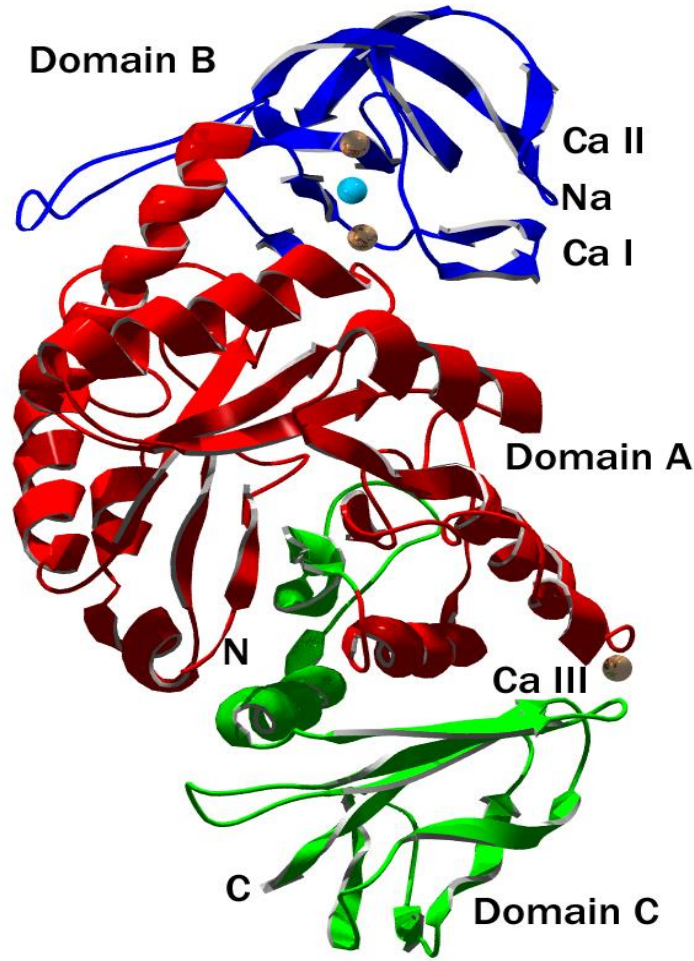
α -amilazların yapısı tek bir polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Bu zincir katlandığında genel olarak A, B ve C adı verilen 3 alan meydana gelmektedir. (şekil 1.6.) [67]. Katalitik işleve sahip olan A alanı α -amilazlar arasında en çok korunan alan olup, birincil sekansın N-terminal uçunda bulunur ve $(\beta/\alpha)_8$ fii yapısına sahiptir. Bu yapı birbirine paralel 8 adet β -tabakasının son derece simetrik olarak katlanarak bir fii biçiminde düzenlenmesi ve etrafının da 8 adet α -heliks yapı ile çevrelenmesi ile meydana gelmektedir. $(\beta/\alpha)_8$ fii yapısı ilk olarak tavuk kasında bulunan trioz fosfat izomerazın yapısında bulunmuştur ve bu sebepten TIM fiisi olarak adlandırılmıştır [70]. TIM fiisi, sadece α -amilaz ailesi içinde bulunan enzimlerde değil, birbirinden çok farklı işlevlere sahip enzimlerin yapısında da bulunmaktadır. Bilinen tüm enzimlerin %10'unda bu yapının bulunduğu tahmin edilmektedir <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/madanm/pdfs/chapter2.pdf> [67]. TIM fiisi hidroliz ya da α -konformasyonuna sahip glikozit bağlarının oluşmasından sorumludur. α -amilaz ailesi içinde bulunan bütün enzimler TIM fiisinin üç numaralı β -tabakası ve üç numaralı α -heliks arasından çıkıntı yaparak oluşan B-alanına sahiptir. B-alanının uzunluğu 44 ile 133 amino asit kalıntısı arasında değişmekte ve substrat veya Ca^{+2} bağlanması da görev almaktadır. B-alanı substrat bağlama yarığının büyük kısmını oluşturur ve bu alanın α -amilazlar arasında görülen substrat zgllğu farklılıkları için önemli olduğu tahmin edilmektedir [71]. Bununla birlikte glikosidazlar arasında B alanında büyük benzerlik görünmektedir. A ve B alanları dışında, α -amilaz ailesi içerisinde dokuz farklı alan tanımlanmıştır. α -1,6 glikozit bağlarını parçalayan bazı enzimlerin yapısında A alanından çıkıntı yaparak oluşan 2 veya 7. alan bulunmaktadır. A alanının n ya da arka tarafında kalan alanlar ise C alanından I alanına kadar isimlendirilir. C alanı amino asit sekansının C terminal bölümünde bulunmaktadır ve yunan anahtarı motifi (dört bitişik anti-paralel iplik ve onları birleştirici ipliklerden oluşan yapı) yapısına sahiptir [8]. C- alanının fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte A-alanının hidrofobik altbirimlerini stabilize ettiği ve substrat bağlanmasına yardımcı olabileceği

düşünülmektedir. Örneğin siklodekstrin glikosil-transferaz'ın C-alanında onun ham nişastaya bağlanmasını sağlayan bir maltoz bağlanma bölgesi bulunmaktadır [72]. Holm ve ark (1990) *Bacillus stearothermophilus* α -amilazı üzerinde yaptıkları mutasyon deneyleri sonucunda, C-alanının enzim aktivitesinde de rol aldığını önermişlerdir [73]. Hem B hem de C alanı yaklaşık olarak TIM fiçisinin karşı tarafında bulunur. Maltogenik α -amilazlarda ve siklodekstrin glikosiltransferaz enzimlerinde C-alanını fonksiyonu kesin olarak bilinmeyen D-alanı takip eder. Ham nişastayı hidrolizleme özelliğine sahip bazı α -amilazlarda ise E alanı olarak adlandırılan ham nişasta bağlanma alanları bulunmaktadır [74]. α -amilaz ailesi içinde tanımlanan diğer alanlar ise N-terminal tarafında bulunan F, H ve G alanlarıdır. Bu alanlara sahip olan enzimler endo aktivite veya dallanmış substratların α -1,6 glikozidik bağlarını hidrolizleyebilirler. α -amilaz enzim ailesine ait bazı enzimlerin alan yapıları ve substrat tercihleri Tablo 1.2.'de verilmiştir.

Tablo 1.2. α -amilaz enzim ailesine ait bazı enzimlerin alan yapıları

| Enzim | EC numarası | Alanlar | Ana Substrat |
|----------------------------------|-------------|---------------|-------------------|
| Glukan dallandırma enzimi | 2.4.1.18 | A, B, F | Nişasta, glikojen |
| Siklodekstrin glicosiltransferaz | 2.4.1.19 | A, B, C, D, E | Nişasta |
| Amilomaltaz | 2.4.1.25 | A, B1, B2 | Nişasta, glikojen |
| α -Amilaz | 3.2.1.1 | A, B, C | Nişasta |
| Oligo-1,6-glukosidaz | 3.2.1.10 | A, B | Amilopectin |
| Amilopullulanase | 3.2.1.41 | A, B, H, G, 1 | Pullulan |
| Siklomaltodekstrinaz | 3.2.1.54 | A, B | Siklodekstrinler |
| İzoamilaz | 3.2.1.68 | A, B, F, 7 | Amilopectin |
| Maltotetraoz oluşturan amilaz | 3.2.1.60 | A, B, C, E | Nişasta |
| Maltojenic Amilaz | 3.2.1.133 | A, B, C, D, E | Nişasta |
| Neopullulanaz | 3.2.1.135 | A, B, G | Pullulan |

α -amilazlar incelendiğinde birbirlerinden çok farklı termal karaktere sahip oldukları görülmüştür. *Bacillus* α -amilazların diğer amilazlar ile karşılaştırıldığında termal kararlılık ve inaktivasyon için daha yüksek sıcaklıklara maruz kalmaları gerektiği bilinmektedir [11].



Şekil 1.6. *Bacillus licheniformis* α -amilazın 3 boyutlu yapısı (BLA, PDBcode: 1BLI) yapısı. (Alan A kırmızı, alan B mavi ve alan C’de yeşil ile gösterilmiştir. Doğal formuna bağlı olan üç adet kalsiyum iyonu altın renginde, sodyum iyonu ise mavi renk ile gösterilmiştir) [75].

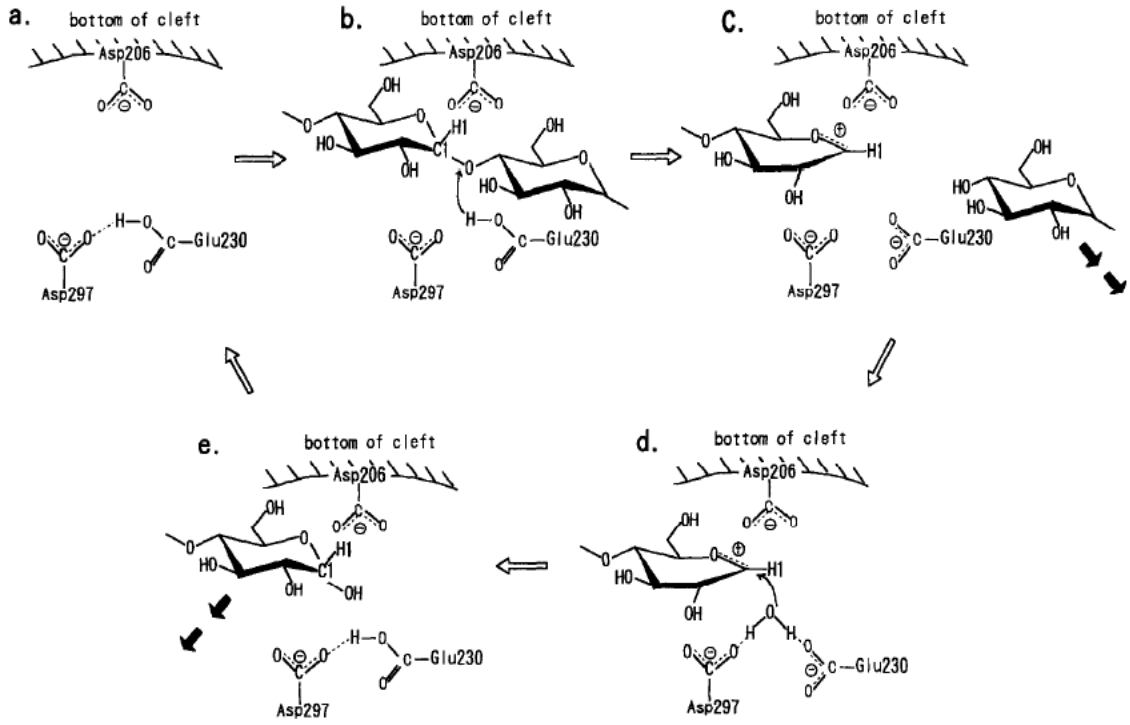
Memeli α -amilazlarının yapısında, kararlılık kazandıran birkaç disulfid köprüsü bulunmasına karşın, bakteriyel amilazlar genellikle bundan yoksundur. Birkaç istisna dışında bilinen tüm α -amilazlar da alan A ve B ara fazında korunmuş kalsiyum iyonu bulunmaktadır. Bu kalsiyum iyonu aktif enzimin kararlılığı için gereklidir [76]. Ca^{+2} iyonu tercihen karboksilat ve diğer oksijen ligandlarına bağlandığı için, bu metal protein stabilizasyonunda diğer metallere göre daha fazla rol oynar. Ca^{+2} iyonunun proteinden uzaklaştırıldığında proteinlerin katalitik özelliklerini kaybettiği uygun koşullar altında kalsiyum iyonunu protein içinde yeniden restorasyonu sağlandığında aktivitenin büyük ölçüde geri kazanıldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [8]. Bu sebepten

dolayı α -amilazların karakterize edilen prostetik grupları ile birlikte metallo enzimlerin yeni bir sınıfı olduğu önerilmiştir.

Pozisyon olarak Ca^{+2} iyonu proteinin aktif bölgesinin çok uzağında yer aldığı için, enzim aktivitesinden daha çok yapısal bir görevi olduğu önerilmektedir [77]. Ca^{+2} iyonunun, enzimin termal kararlılığını dengeleyici görevini, protein içinde bulunan hidrofobik altbirimlerini, salting out (dışarı tuzlama) yolu ile daha kompakt bir yapıya kavuşturması ile başardığı düşünülmektedir.

Bacillus α -amilazlar üç veya 4 kalsiyum iyonu ve bir sodyum iyonu içerirler ve kalsiyum-sodyum-kalsiyum üçlü metal köprüsünü A ve B alanının arasında oluştururlar. Bu metalik üçlü protein yapısının doğru biçimde olmasına ve enzimin termal inaktivasyona daha fazla dayanabilmesini sağladığı düşünülmektedir [8].

Bacillus amyloliquefaciens α -amilazında özellikle 3 amino asidin (Asp 262, Glu 292 ve Asp 359) katalitik aktivite için gerekli olduğu bilinmektedir. Asp 262 katalitik nükleofil görevini görürken Glu 292 katalitik hidrojen (proton donor) vericisi olarak görev yapmaktadır. Üçüncü aminoasit olan Asp 359'un ise substrat ile hidrojen bağı oluşturup, Glu 292'nin pKa değerini yükselterek katalize yardımcı olduğu düşünülmektedir. TAKA amilazın katalitik mekanizması ve görevli olan 3 amino asit Şekil 1.7.'de gösterilmiştir. Nonako ve ark (2003) [74] tarafından yapısının ve fonksiyonunu koruması için kalsiyum iyonuna ihtiyaç duymayan ve 2 tane sodyum iyonu içeren *Bacillus* α -amilaz olan Amy K38'yı rapor etmişlerdir. Bununla birlikte *P.furiosus* ve *Bacillus* sp. KR-8104'ün ekstrasellüler α -amilazlarının da Ca^{+2} iyonuna ihtiyaç duymadıkları gösterilmiştir [20, 78]. Termal kararlı bir α -amilaz olan *Bacillus thermooleovorans* Np54'ünde aktivite ve üretim içinde Ca^{+2} iyonuna ihtiyaç duymadığı Malhotra ve ark tarafından gösterilmiştir [79]. Bunun dışında Ghollasi ve ark (2010) [77] moleküler biyoloji yöntemleri kullanarak kalsiyum bağlanma bölgesinde A53S ve H58I mutasyonları yardımı ile *Bacillus megaterium* WHO'nun termal kararlılığını ve kalsiyum bağımsızlığını geliştirmeye çalışmışlardır [80]. Bazı amilazların aktif bölgelerinde ise klorür iyonu bulunmaktadır. Klorür iyonunun katalitik verimi artırdığı düşünülmektedir.



Şekil 1.7. Enzim-substrat kompleksinin üç boyutlu yapısına göre TAKA amilazın katalitik mekanizması [67].

α -amilaz ailesine ait bir enzimin aktif bölgesi bir dizi alt birimden (substides) meydana gelir ve her bir alt birim substratın bir glukoz rezidüsü ile etkileşime geçme kapasitesine sahiptir. Bu alt birimler, enzim yapısında bulunan döngülerin üzerine yerleşmiş amino asitlerden oluşan yan zincirlerdir ve katalitik alandaki TIM fiçisindeki β -tabakanın C-terminal ucu ile ona komşu olan α -heliksin N-terminal ucunu birleştirirler. Yapıda ki β - α looplarının mimarisinin enzimden enzime farklılıklar göstermesinden dolayı, aktif bölgede bulunan alt birimlerin sayısı ve doğası değişiklik göstermekte, bu da enzimlere kendilerine özgü karakterler sağlamaktadırlar.

Bu sebepten α -amilaz ailesine mensup farklı enzimler farklı substratlar üzerinde etki göstermektedirler. Sadece α -bağlı glikoz rezidüsünün altbirim -1'e bağlanma zorunluluğu ortak bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Maltojenik amilazlarda, C alanı, fonksiyonu kesin olarak bilinmeyen D-alanı tarafından takip edilmektedir.

Bütün α -amilazların TIM fiçisi yapıları aktif bölgeleri ile ilişkili 4 adet iyi korunmuş bölge içermektedir. Bunlar;

- i. Birinci bölge: substratın glukoz ile etkileşime giren C-terminal uçundaki 3. β -tabakası ve histidin

- ii. İkinci bölge: kataliz sırasında nükleofil olarak rol alan Asp sahip 4. β -tabakası
- iii. Üçüncü bölge: proton vericisi olarak görev yapan glutamik asit içeren 5. β -tabakası
- iv. Dördüncü bölge: Substratın glikoz molekülü ile hidrojen bağı oluşturan 7. β -tabakasında bulunan His ve Asp amino asitleri

1.3. α -amilase Enziminin Endüstriyel Uygulamaları

Büyük ölçekli nişasta üretim endüstrisinin geçmişi 1900'li yılların ortalarına kadar uzanmaktadır. Geçmiş ile karşılaştırıldığında, günümüzde, glikoz ya da fruktoz şurubu üretiminde, nişastanın asit ile hidrolizi yerine, nişasta-dönüştürme enzimlerinin kullanımının yaygınlaştığı görülmektedir.

1.3.1. Nişasta endüstrisi

α -amilazların nişasta sektörü içindeki en yaygın kullanımları, fruktoz ve glukoz şurubu üretim prosesinde ki basamaklardan biri olan nişastanın sıvılaştırılma işlemi sırasında kullanılmalarıdır.

Büyük ölçekli nişasta üretim endüstrisinin geçmişi 1900'li yılların ortalarına kadar uzanmaktadır. Glikoz şurubu ilk olarak 1811 yılında Alman bilim adamı Kirchoff tarafından bulunan yöntem ile nişasta süspansiyonunun seyreltilmiş asit ile hidrolizi ile elde edilmiştir. Ancak bu yöntem 1921 yılına kadar endüstriyel boyuta taşınmamıştır. 1921 yılında Newkirt nişastanın su ile karıştırıldıktan sonra nişasta granüllerinin çözülmesi için kaynatıldığı (jelatilizasyon) ve daha sonra arzulanan hidroliz derecesine göre asit ile muamele edildiği ticari bir süreçten bahsetmiştir. Günümüzde kaynatmak yerine, içinde 100-175°C de buhar ile karışan nişastanın geçtiği jet-fırınlarda bu işlemler yapılmaktadır. Bu jet fırınlarında, ısıtılan nişasta bulamacı, daha sonra ki enzimatik işlemler için hidroliz reaktörüne aktarılmaktadır. O yıllarda ki en büyük problem, jelâtinleşme aşamasında oluşan bulamacın çok viskoz bir yapısı olduğundan karıştırma ve pompalama sırasında ciddi problemlere sebep olmasıdır. Bu sorun termal-kararlı α -amilazların bulunması ile aşılmıştır. Fruktoz şurubu hazırlanma prosesinin sıvılaştırma aşamasında kullanılan α -amilazlar, termal kararlılıkları sayesinde, nişasta karışımına jet fırınlarına girmeden katılabildikleri için, jelatinleştirme ve sıvılaştırma basamaklarının birleştirilebilmesine imkan sağlamışlardır. Bu ilk aşamada pH değeri

6'ya yükseltilen %30-35 katı madde içeren nişasta bulamacı α -amilaz enzimi ile karıştırıldıktan sonra jet fırınlarında 90-105 °C'de 90 dakika işleme tabii tutulur. 100°C'nin üstüne çıkılmasının sebebi de nişasta-yağ bileşiklerinin uzaklaştırılması içindir. Bu aşama da kullanılan ilk enzim *Bacillus amyloliquefaciens* den elde edilen α -amilaz iken günümüzde bu enzimin yerini *Bacillus stearothermophilus* veya *Bacillus licheniformis* den elde edilen amilazlar almıştır [4, 67].

Günümüzde kullanılan α -amilaz ile ilgili en büyük problem pH 5.9'un altında yüksek sıcaklıklarıda aktivite gösterememeleridir. Bu sebepten normal pH'sı 4.5 olan nişasta bulamacının pH'sı NaOH eklenerek pH 6'ya yükseltilmektedir. Ayrıca bu enzimler aktivite ve yapısal kararlılıklarını koruyabilmek için Ca^{+2} gereksinim duyduklarından, ortama bu metal iyonununda eklenmesi gerekmektedir. Bu sebepten düşük pH değerlerinde de aktivite gösteren Ca^{+2} gereksinimi olmayan yeni enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla ilgili en ümit verici gelişme *Pyrococcus furiosus*'dan elde edilen 130 °C'lerde bile aktivitesini koruyan metal iyonuna ihtiyaç duymayan ve substrat spesifitesi olan ekstrasellüler α -amilazdır [81].

Sakkarifikasyon (Şekerleştirme) adı verilen ikinci aşamasında, hidrolizlenmiş nişasta şurubu, zincirin indirgen olmayan uçlardaki α -1,4 glikozit bağlarını hidrolizleyen ekzo-etkili glukoamilaz enzimi yardımı ile yüksek konsantrasyonda glukoz şurubuna dönüştürülür (>%95 glukoz). Bu enzim optimum olarak pH 4.2 ve 60°C de aktivite göstermesi sebebi ile sıvılaştırma sonrası hidrolizlenmiş nişasta şurubunun pH'sı hidroklorik asit ile 4.5 seviyelerine getirilir. Bu aşamada istenilen son ürünün elde edilmesi, özelliklerine göre 60-62°C de 12-96 saat sürebilmektedir. Bu aşamada karşılaşılan diğer bir problem ise, glikoamilazların α -1,4 glikozit bağlarını kırmak için özelleştirilmeleri sebebi ile α -1,6 glikozit bağlarını çok yavaş kırabilmesidir. Bu yüzden ortamda izomaltoz birikmesi olmaktadır. Bu sorunda glikoamilaz ile aynı koşullarda aktivite gösteren ve α -1,6 glikozit bağlarını kırabilen pullunase enziminin kullanılması ile aşılmaktadır [82].

Endüstriyel nişasta işlemindeki üçüncü basamak, glukoz şurubunun kendisinden iki kat daha tatlı olan izomeri früktoz şurubuna dönüştürülmesi işlemidir. Bu basamakta ise kullanılan enzim ise gluco isomerase (EC 5.3.1.5) enzimidir. Glukoz şurubu ilk olarak karbon ile filtrasyon edilerek yaklaşık %40 kuru madde içeriğine konsantre edilir. Daha sonra bu şurup dolgu maddesinde immobilize glikoamilaz enzimi

içeren kolonlardan geçirilerek früktoz şurubu elde edilir [83]. Bu enzimler sayesinde artık endüstriyel nişasta işleminde ki asit hidrolizi ortadan kalkmıştır.

Fruktoz şurubu dışında, genellikle glikoz, %2.2; maltoz, %37,5; maltotriose, %46.4; ve daha büyük maltooligosakkaritler %14 içeren maltooligomer karışımı da yeni bir ticari ürün olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu üründe mısır nişastasının α -amilaz, β -amilaz ve pullulanase enzimleri ile parçalanması sonucunda elde edilir. Maltooligomer karışımı, yüksek miktarda higroskopik (nem çekici) özelliğe sahiptir. Bu özelliği sayesinde karıştırıldıkları yiyeceklerin içinde nem düzenleme görevini yaparlar. Maltooligomer karışımı, sükrözden daha az tatlı bir yapıdadır ve diyet tatlı ve yiyeceklerin içinde sükröz veya diğer sakkaritlerin yerine kullanılabilirler. Ayrıca içerdiği glikoz miktarı daha az olduğu için mısır şurubundan daha az viskoziteye sahiptir. Maltooligomer karışımı bu özellikleri sayesinde besinlerin içinde bulunan sükrözün kristalleşmesini de engellemektedirler.

1.3.2. Deterjan endüstrisi

Deterjan endüstrisi, hem hacimsel hem de değer olarak enzim kullanımında birincil durumdadır. Enzimler modern kompakt deterjanların formülasyonuna katılarak deterjanlarının etkisini arttırmakta ayrıca onların daha çevresel olmalarına da katkıda bulunmaktadırlar. Deterjanlarda enzim kullanılmasının enzim içermeyen deterjanlara göre diğer bir avantajı ise enzimlerin yıkama sıcaklıklarını düşürmeleri sebebi ile yıkama için çok daha ılımlı koşullar sağlamalarıdır. İlk zamanlarda bulaşık makinelerinde kullanılan deterjanlar solunmaları halinde ciddi rahatsızlıklara sebep olmakta ve porselen gibi hassas yemek takımlara zarar vermekteydiler [6]. Bu sorunun, tablet tipi katı deterjanların üretilmesi ile bu sorun çözülmüştür. Günümüzde, otomatik bulaşık makineleri için geliştirilecek deterjanlarda kullanılacak α -amilazlara artan bir talep bulunmaktadır.

İlk kez 1975 yılında toz çamaşır deterjanlarının formülasyonuna katılan α -amilazlar bugün evlerimizde kullandığımız sıvı deterjanların %90'nının içeriğinde yer almaktadır [4, 84]. Deterjan sektöründe kullanılan amilazlarda früktoz şurup üretiminde kullanılan amilazlar da aranan özelliklerden çok farklı özellikler aranmaktadır. Deterjan formülasyonunda kullanılacak enzimlerin düşük sıcaklıklarda ve alkaline pH aralığında (8-11) çalışabilmeleri, deterjan içeriğinde bulunan oksidantların yarattığı okside edici

yıkama şartlarına karşı da kararlılıklarını korumaları gerekmektedir. Deterjanlar da kullanılan α -amilazlarda karşılaşılan en büyük problem düşük kalsiyum içeren ortamlarda aktivitelerini ve kararlılıklarını kaybetmeleridir [4, 85]. İki büyük deterjan enzim sağlayıcısı olan Novozymes ve Genencore International daki araştırmacılar, bağımsız olarak oksitlenmeye karşı hassas olan amino asit rezidülerini diğer amino asitler ile değiştirerek enzimlerinin oksidative ajanlara karşı kararlılığını arttırmayı başarmışlardır. Bunun için *B.licheniformis*'te 197. pozisyondaki metiyonin amino asidini lösin ile değiştirilmiştir. Novozymes ve Genencore International ürettikleri ürünleri sırasıyla Duramyl® ve Purafect OxAm® marka isimi ile piyasaya sürmüşlerdir. Bunun dışında deterjan endüstrisinde kullanılan ticarileşmiş amilazlar genel olarak *Bacillus* ve *Aspergillus* kökenlidir [86].

1.3.3. Tekstil endüstrisi

Dokuma sırasında, kullanılan iplerin eğilmemesi ve kopmaya karşı sağlamlık ve direnç kazanmaları için ilk önce sıcak nişasta ile kaplanmaları gerekmektedir. Bu işleme haşılama denilmektedir. Birçok farklı haşılama materyali bulunsa da nişasta ucuz olması, dünyanın birçok bölgesinde kolayca temin edilebilmesi ve işlem sonrasında kolayca uzaklaştırılabilmesi sebebi ile üretim proseslerinde en çok kullanılan haşıl maddesidir. Tekstil ürünlerinin dokumaları tamamlandıktan sonra, boya işlemine girmeden önce, üzerlerine kaplanmış olan nişastanın kumaştan α -amilaz uygulaması ile uzaklaştırılması gerekmektedir. Haşıl alma ismi verilen bu süreçte nişastayı liflere zarar vermeden seçici olarak uzaklaştırdığı için α -amilazlar en çok tercih edilen haşıl alma ajanlarıdır. Özellikle *Bacillus subtilis*'ten elde edilen α -amilaz enzimi, bu alanda Japonya'da endüstriyel boyutlarda üretilip 1939'dan itibaren kullanılmaktadır [6, 87]

1.3.4. Kâğıt endüstrisi

Kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisindeki üretim süreçlerinde kâğıtları maruz kalacakları mekanik hasarlara karşı korumak amacı ile kâğıt yüzeyleri nişasta ile kaplanmaktadır. Kaplama sırasında kullanılacak düşük viskoziteye ve yüksek molekül ağırlığına sahip nişastanın elde edilmesi amacı ile α -amilaz enzimi kullanılmaktadır. Bu kaplama işlemi kâğıt yüzeyinin yeterince pürüzsüz hale gelmesini, kâğıdın dayanıklılığının ve kalitesinin artmasını ve yazma ve silinebilme kalitesinin arttırılmasını sağlamaktadır [67, 88]. Doğal nişastanın viskozitesi kâğıt kaplaması için

çok yüksek olduğu için nişasta α -amilaz enzimi ile yıkılarak farklı kâğıt türleri için farklı viskozitelere sahip nişasta solüsyonları elde edilmektedir. Tekrarlanabilir sonuçlar alınabilmesi için süreç sırasında kullanılan nişasta solüsyonunun sabit viskoziteye sahip olması çok önemlidir. 45-60°C sıcaklıktaki nişasta solüsyonları kâğıtların üzerine döküldükten sonra kâğıt tarafından ikili merdanelerden geçtiği sırada yüzeyine kaplanmaktadır. Kâğıt endüstrisinde kullanılan bazı amilazlara örnek olarak Amizyme® (PMP Fermentation Products Peoria, USA), Termamyl®, Fungamyl, BAN® (Novozymes, Denmark) ve ticari olarak kullanılan α -amylase G9995® (Enzyme Biosystems, USA) [4] verilebilir.

1.3.5. Ekmek ve fırıncılık endüstrisi

Fırıncılık endüstrisi de nişasta ve nişastayı modifiye eden enzimleri yüzlerce yıldır yüksek kalitede ürünler üretmek için kullanmaktadır. α -amilazlar da bu sektörde uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır [89]. Bu enzimler ekmek hamuruna katılarak unun içindeki nişastayı dekstrinlere parçalayıp maya tarafından daha rahat fermente edilebilir forma getirmektedirler. Ayrıca α -amilaz enzimi katılan hamurda fermantasyon hızı artar, hamurun viskozitesi düşer, daha iyi kabarır ve son ürün olan ekmek daha yumuşak bir yapıya, güzel bir kabuk rengine ve dokuya sahip olur. Günümüzde hamur ve/veya ekmeğin gelişmesine katkıda bulunduğu önerilen pek çok farklı enzim içeren preparatlar ticari olarak kullanılmaktadır. Bu enzimlere örnek olarak proteazlar, lipazlar, ksilanazlar, pullunazlar, hemiselülazlar, glikoz oksidazlar v.b verilebilir. Ancak yine de hiçbiri kendi başına nişasta fraksiyonu üzerine etki edemediğinden α -amilazların yerine geçmeyi başaramamıştır.

Bazı amilazların ekmek için sertleşme hızını azaltarak bayatlama geciktirici ajanlar olarak hareket ettikleri bulunmuştur [90]. Bu özellik ekmeğin raf ömrünü uzatması sebebi ile ekonomik olarak da çok önemlidir. Sadece Amerika da her yıl bayatlayan ekmeklerin atılması sebebi ile 1 milyar dolarlık maddi kayıp yaşanmaktadır. Bayatlama geciktirici özelliğe sahip α -amilazlar genellikle orta dereceli termal kararlılığa (ITS) sahip amilazlardır. Bu bağlamda en iyi bayatlama geciktirici ajan olarak *Bacillus stearothermophilus*'dan elde edilen maltojenik α -amilaz gösterilmektedir [91]. Bunun sebebi ITS α -amilazların, nişastanın jelatinleşmesi sırasında aktifken, daha sonraki pişirme aşamalarında aktivitelerini kaybetmeleridir. Bu sayede hamur içinde bayatlama

geçiktirici özellikleri olduğu belirlenen 4-9 glukoz biriminden oluşan dekstrinlerin varlığı artmaktadır. Eğer ITS α -amilazlar yerine yüksek termal kararlılığa sahip amilazlar kullanılırsa bu enzimler pişirme sıcaklıklarında da aktif olabildiklerinden nişasta hidrolizine devam etmekte bu da ortamda maltoz gibi daha küçük şekerlerin birikmesine sebep olmaktadır. Maltoz küçük yapısı sebebi ile hamur içinde oluşan ağdan kolaylıkla difüze olabildiği için bayatlama geciktirici etkiyi gösteremez ayrıca hamurun yapışkan olmasına sebep olur. Doğada çok farklı çeşit amilazın varlığı bilinmesine karşın ITS özelliği olan çok az mikroorganizma rapor edilmiştir [92].

Bunun dışında kek gibi havalandırmanın yapıldığı fırıncılık ürünlerinde, glikoz şurubu yumurta akındaki albümin veya jelâtinin etkinliğini artırır. Böylece keklerin kuruması önlenirken, nemlilik de sağlanır ve dolayısı ile ürünlerin raf ömrü uzar. Turta dolgu malzemelerinde ürünün ozmotik basıncını kontrol ederek meyvelerin nem kaybını önler [58]

1.3.6. Yakıt ve alkol üretimi

Alkol üretimi için ham madde olarak kullanılan nişastanın sıvılaştırılması da önemli bir uygulama alanıdır. *Bacillus licheniformis*, rekombinant *Escherichia coli* veya *Bacillus subtilis* suşları gibi amilolitik organizmalardan elde edilen α -amilaz enzimi tarafından sıvılaştırılan nişasta daha sonra glikoamilaz enzimi tarafından fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmektedir[6]. Daha sonra biyoetanol veya bira üretiminde kullanılmak üzere dönüştürülen bu şeker karışımına etanol fermente eden bakteriler (*Saccharomyces cerevisia*) aşılansarak alkol üretimi sağlanmaktadır [93].

1.4. Önceki Çalışmalar

Hidroliz sonucunda indirgenen şeker miktarının belirlenmesi ve bu sayede enzim aktivitesinin hesaplanması için dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemini Miller (1959) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem 3,5-dinitrosalisilik asitin, 3-amino-5-nitrosalisilik asite indirgenmesini ve aldehit grupların karboksilik gruplara okside olurken gelişen renk reaksiyonunun spektrofotometrik yöntem ile belirlenmesi esasına dayanmaktadır. [94].

Saito ve Yamamoto (1973), *Bacillus licheniformis* de α -amilaz üretiminde farklı karbon kaynaklarının etkilerini araştırmışlardır [13].

Morgan ve Priest (1973), *Bacillus licheniformis türünden* izole edilen 10 farklı izolatin thermostabil özelliklerini araştırmışlardır. Bu izolatlardan elde edilen enzimlerin, 85°C de 60 dakika boyunca aktivitelerinin %98'ini koruduğunu, rapor etmişlerdir [15].

1987 yılında, nişastanın sıvılaştırılmasında kullanılabilecek geniş pH aralığında aktivite gösterebilen thermostabil amilaz üreten *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13 suşu rapor edilmiştir (Bajpai ve Bajpai (1987),) *B.licheniformis* pH 5.0-10.0 ve 25-50°C sıcaklıklar arasında, enzimi üretebilmekte ve maksimum enzim üretimi 35 °C sıcaklıkta elde edilmektedir [95].

Feller ve ark, (1994) Antartika'dan izole elden sikrofilik *Alteromonas haloplanctis* A23'ün kararlılık ve yapısal analizi üzerinde çalışmışlardır. Amino asit benzerlikleri karşılaştırıldığında domuz pankreatik amilazı ile % 66 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. [96].

Kim ve ark., (1995), Alkolofilik bir bakteri olan *Bacillus* sp. strain GM8901 izolatinın pH 10.5 ve 50 derecede büyütüldüğünde 5 tane alkalın amilaz ürettiğini bulmuşlardır. Büyümenin erken dönemlerinde amilaz I (AmyI)'in üretildiği ve daha sonra üretimin ileri aşamaların da ortaya çıkan diğer 4 amilaz enziminin de amyI'in proteolitik parçalanması ile oluştuğunu bulmuşlardır. Amy I nişastanın hidrolizi sonucunda ağırlıklı olarak maltotetroz üretirken, orta düzeyde de maltoheksoz ve maltopentoz üretmektedir [44].

Mctigue ve ark, (1995), Alkalofilik *Bacillus* sp. IMD 370 den izole edilen alkalın amilazın etki mekanizmasının oldukça farklı olması sebebi ile amilolitik enzimlerin geleneksel sınıflandırma şemasının içine yerleştirmekte zorluk çekmişlerdir. Bu enzimin, hem alfa-amilaz gibi hem endo hem de amiloglukosidaz gibi ekzo arasında bir hareket mekanizmasına sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca saflaştırılan enzimin izoelektrik noktasının 4.9 ve molekül ağırlığının 150 kDa olduğu rapor edilmiştir [97].

Lin ve ark (1998), Maltoz, nişasta ve amilozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı üretim sonucunda yapılan zimogram analizinde *Bacillus* sp. TS-23 suşundan izole edilen fermentasyon sıvısında moleküler ağırlıkları 42 ve 150 kDa olan iki amilaz bandının varlığı belirlenmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklığının sırasıyla 9.0 ve 70°C olduğu ve 5mM Ca⁺² varlığında 90°C'de aktivite

gösterebildiği Lin ve ark. (1998) tarafından rapor edilmiştir. Saflaştırılan enzimin ham nişastayı kısmen parçalayabildiği ve son ürün olarak DP 3,4,5 olan ürünler verdiğini de belirtmişlerdir [98].

Malhotra ve ark (2000), yarılanma ömrü 100°C'de 3 saat olan ekstrem termofil özellikteki *Bacillus thermooleoavarans* NP54 suşundan elde edilen α -amilazın termostabilite için Ca^{+2} 'a ihtiyaç duymadığını göstermiştir [79].

D'Amico ve ark, (2000) ise yaptıkları çalışmada, klorür-bağımlı amilazların yapısal benzerlik ve evrimsel ilişkilerini incelemişlerdir. Veri bankasında bulunan α -amilaz dizilerini klor-bağlama bölgelerini oluşturan Arg195, Asn298 ve Arg/Lys337 rezidülerinin varlığını taramışlar ve klorür iyonuna potansiyel olarak bağlanabilecek 38 α -amilazın olabileceğini göstermişlerdir. Kristal yapısı bilinen yapılar incelendiğinde bütün klorür-bağımlı α -amilazların dört disülfid bağ oluşturmak için kesinlikle korunmuş 8 adet Cys rezidüsüne ihtiyacı olduğunu belirlenmişlerdir [99].

Ben Messaoud ve ark (2004) *Bacillus subtilis* US 116 suşundan izole edilen amilaz enziminin yarılanma ömrünün 70°C'de 3 saat, 65°C'de ise 5 saat olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, nişasta hidrolizi sonunda enzimin son ürün olarak %20 maltoheptaoz (G7) ve %30 maltoheksoz ürettiğini rapor etmişlerdir. [41].

Kim ve ark, (2004) ise diğer amilazların tersine, *Bacillus subtilis* SUH-42 α -amilazını ilk kez olarak sitoplazmada tespit etmişlerdir. Maltojenik amilaz kodlayan gene karşılık gelen *bbmA* geninin sekansına bakıldığında da *Bacillus subtilis* 168'de bulunan ve fonksiyonu bilinmeyen *yvdF* geni ile neredeyse aynı olduğu bulunmuştur. *bbmA* genini probe olarak kullanarak yaptıkları Southern Blot analizleri ile de bu genin *Bacillus* soyları arasında çok sık rastlanan bir gen olduğu belirlenmiştir [100].

Aiyer (2004), ekstrasellüler α -amilaz üreten *Bacillus licheniformis* SPT 27 izolatu ile üretim ortamında ki karbon nitrojen oranının amilaz üretimi üzerindeki etkisini araştırmışlar ve bu organizma için bunun 1:1 olduğunu belirlemişlerdir [101].

Konsula ve ark (2004), mezofilik *Bacillus subtilis* den elde ettikleri alfa-amilaz enzimini karakterize ettiklerinde en yüksek aktivitenin 135°C ve pH 6.5'da gerçekleştiğini bulmuşlardır. Ayrıca enzimin termal kararlılığının kalsiyum ve nişasta varlığında arttığını belirlemişlerdir [9].

Goyal ve ark, (2005) topraktan örneklerinden izole ettikleri *Bacillus* sp. I-3 izolatinın ham patates nişastasının sindiriminde yüksek aktivite gösterdiğini göstermiştir. Çeşitli çevresel ve kültürel koşulun optimizasyonu sonucunda 642 U/ml 'lik aktiviteye ulaşmışlar ve enzimin maksimum aktivitesinin 70°C ve pH 7.0 'de elde edildiğini bulmuşlardır [16].

Bernhardsdotter ve ark (2005), izole ettikleri pH 10.5 ve 37°C de büyütülen *Bacillus* sp L1711 izolatin şelatör dirençli alkali amilaz ürettiğini belirlemiştir. Enzim 55°C de tamamen inaktif olurken, termal kararlılığının Ca⁺² varlığında değişmediğini de rapor etmişlerdir [102].

Mollania ve ark, (2010) İran'ın sıcak su kaynaklarından izole ettikleri *Geobacillus thermodenitrificans* bakterisinden termofilik ve fitat'a dayanıklı amilolitik enzim üretilip karakterize etmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığı 52 kDa, optimum sıcaklığı ve pH'sı sırasıyla 80°C ve 5-7 olarak belirlenmiştir. Nişasta hidrolizi için *K_m* ve *V_{max}* değerleri sırasıyla 3mg ml⁻¹ and 6.5µmol min⁻¹ olarak rapor edilmiş. 10mM konsantrasyona kadar fitik asidin enzim aktivitesini etkilemediği bulunmuştur [103].

Ben Mabrouk ve ark (2011) *Bacillus* sp. US149 dan elde ettikleri maltojenik amilaz üzerinde sekans benzerlikleri ve homoloji modelleme yöntemleri kullanarak hedef amino asit olarak belirledikleri glisin 312 ve lizin 436 rezidülerini yönlendirilmiş mutagenез ile değiştirerek enzimin termal kararlılığını iyileştirmeyi başarmışlardır [104].

Zhang ve ark, (2011) yaptıkları çalışmada mikrodalga ışınlanmasının α-amilazın ikincil yapısı üzerindeki etkisini circular dichorism cihazı ile araştırmışlardır. CD spektrasında 193 nm lambda da görülen tepe yüksekliklerinin microdalga ışınması ile azaldığı belirlenmiştir. Azalma hızı % 140 ile % 220 arasında değişiklik göstermiştir. Ayrıca 60 dakika microdalga ışınına maruz bırakılan örnekte lambda 193 nm deki tepenin yok olduğunu göstermişlerdir [105].

Tawil ve ark, (2012) *Anoxybacillus flavothermus* (AFA) dan elde edilen yeni bir α-amilazın glukoz şurubu üretimi için gerekli jeletinleştirme sıcaklığının çok altında konsantre ham nişastayı hidrolizleyebildiğini bulmuşlardır. AFA'nın %31'lik ham nişasta süspansiyonununun %77' sini hidrolizleyebildiğini göstermişlerdir. Ayrıca %15

den düşük konsantrasyonlar da hidroliz süresi 2-3 saatte tamamlanırken bu konsantrasyonun üstünde 8-24 saat arasına çıktığını da rapor etmişlerdir [106].

Kumar ve Khare 2012, ılımlı halofilik *Marinobacter sp* EMB8 den izole edilen ve maltotrioz ve maltotetraoz üreten amilazdan bahsetmişlerdir. Enzimin molekül ağırlığının 72 kDa olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, %20 NaCl konsantrasyonunda, 80°C sıcaklık ve pH 6.0-11.0'de ve yüksek konsantrasyondaki organik çözücü varlığında EMB8 amilazın kararlılığını koruyabildiğini bulmuşlardır [107].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Deneysel çalışmalar TÜBİTAK-GMBE ve Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı alt yapısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir

2.1. Kimyasallar

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

2.2. Besiyerleri

Tez çalışması kapsamında kullanılan mikroorganizmanın taksonomik karakterizasyonun belirlenmesinde, enzim üretimlerinin belirlenmesinde, çeşitli analiz yöntemlerinin ön aşamaları için farklı besiyeri ortamları kullanılmıştır. Bu ortamlar aşağıda sıralanmıştır.

Besiyeri 1: Nutrient broth (NB)

In vitro (canlı hücre dışında) yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde (izolatların aktivasyonu ve genomik DNA izolasyonu v.b) genel sıvı besiyeri olarak kullanılmıştır.

Bileşimi: Nutrient broth (Merck 1.05493.0500) 8 gr/L

Hazırlanışı: 8 gr/l besiyeri distile su içerisinde eritilmiş ve amaca uygun kaplara (erlen, tüp v.s) dağıtılmış ve 121 °C' de 1.5 atmosfer basınçta 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanan besiyeri berrak ve sarımsı kahverengi olup, 25°C de pH'sı 7.0±0.2 dir. [108]

Besiyeri 2: Nutrient agar (NA)

In vitro (canlı hücre dışında) yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde genel katı besiyeri olarak kullanılmıştır.

Bileşimi: Nutrient agar (Oxoid CM 3) 28 gr/L

Hazırlanışı: 28 gr/L Nutrient agar distile su içerisinde ısıtılarak eritilmiş, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 45-50°C soğutulduktan sonra aseptik koşullarda petri kutularına 20'er ml dökülmüştür. [108].

Besiyeri 3: Triptik soy broth (TSB)

Bu ortam hücre sel yağ asidi analizinde izolatların aktivasyonu için kullanılmıştır.

Bileşimi: Kazein pepton 17g/L; Soya pepton 3g/L; Sodyum klorür 5g/L; Dipotasyum hidrojen fosfat 2.5g/L; Glikoz 2.5g/L

Hazırlanışı: 30 gr/L Tripton soya broth (Fluka 51228) distile su içerisinde çözüldükten sonra 121 °C' de 1.5 atmosfer basınçta 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanan besiyeri berrak ve sarımsı sarımsı renkte olup, 25°C de pH'sı 7.3±0.2 dir [108].

Besiyeri 4: Triptik soy agar (TSA)

Bu ortam hücre sel yağ asidi analizinde izolatların büyütülmesi için katı besiyeri olarak kullanılmıştır.

Bileşimi: Kazein pepton 15g/L; soya pepton 3g/L; sodyum klorid 5g/L; agar 15g/L

Hazırlanışı: 30 gr/L Tripton soya broth (Fluka 22091) distile su içerisinde çözüldükten sonra 121 °C' de 1.5 atmosfer basınçta 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanan besiyeri berrak ve sarımsı sarımsı renkte olup, 25°C de pH'sı 7.3±0.2 dir [108]. (Bergey's, 1986 ve Merck Mikrobiyoloji El Kitabı).

Besiyeri 5: Gliserol Agar

Bu ortam dihidroksi aseton üretiminin belirlenmesinde kullanılmıştır

Bileşimi: Nutrient agar 15g/L; maya özütü (Merck, 1.03753) 2 gr/L; dipotasyum fosfat 1g/L ve gliserol 5ml/L

Hazırlanışı: İçerik distile suda çözüldükten sonra, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası çözelti 45-50°C soğutulduktan sonra aseptik koşullarda petri kutularına 20'şer ml dökülmüştür [108].

Besiyeri 6: Üre Agar

Bileşimi: Üre agar base (Oxoid CM53) 2.4 gr/100ml; üre çözeltisi %20 (w/v)

Hazırlanışı: 2.4 gr Üre agar base (Oxoid CM53), 95 ml distile suda çözülüp homojenize edildikten sonra 121 °C’de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Agar 45°C’ ye kadar soğutulduktan sonra 0,45 µm’lik pore genişliğine sahip membran filtreden geçirilerek sterilize edilen %20’ lik üre çözeltisi agar ortamında son konsantrasyonu %2 olacak şekilde eklendikten sonra besiyeri steril şartlarda petri kutularına paylaştırılmıştır [109].

Besiyeri 7: Yarı katı hareket ortamı

Bu ortam izolatların hareketliliğinin kontrol edilmesinde kullanılmıştır.

Hazırlanışı: 8.0g/L Nutrient broth’ a %1’lik bakteriyolojik agardan sonuç çözeltisinde agar oranı % 0.5 olacak şekilde eklendikten sonra, 121 °C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam 45°C’ ye kadar soğutulduktan sonra aseptik koşullarda steril kapaklı tüplere 5’ er ml paylaştırılmıştır [109].

Besiyeri 7: Endospor ortamı

Bu ortam izolatların endospor incelemeleri için kullanılmıştır [108].

Bileşimi: Nutrient agar 28 gr/L ve MgSO₄ 7H₂O 5 gr/L

Hazırlanışı: Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121 °C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika steriliz edilmiş ve ortam 45°C’ ye kadar soğutulduktan sonra aseptik koşullarda steril petri kutularına dökülmüştür.

Besiyeri 8. Farklı tuz konsantrasyonları içeren nutrient agar ortamı

Bu ortamlar izolatların farklı tuz konsantrasyonları (%2, %5, %7, %10 %12) içeren ortamlarda büyüüp büyümediğinin saptanmasında kullanılmıştır[109].

Hazırlanışı: 100 ml ortam için Nutrient agara 2.8g/L sırasıyla 2, 5, 7,10 ve 12gr NaCl ilave edildikten sonra 121 °C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilerek steril petri kutularına dökülmüştür.

Besiyeri 9. Farklı pH’lar da üreme ortamı

Bu ortam büyüme için pH aralığının belirlenmesinde kullanılmıştır [110].

Hazırlanışı: Nutrient agar ortamı ve aşağıda hazırlanış şekilleri verilen tamponlar ayrı ayrı sterilize edilmiştir. Tamponlar 45 °C' ye soğutulmuş nutrient agar ortamına ilave edilerek iyice çalkalanmış ve steril ortamda petri kutularına dağıtılmıştır.

pH:6.0 HCl eklenerek ayarlamıştır.

pH:7.0 100 ml 1.0 M Sodyum fosfat tampon (pH:7.0) eklenerek ayarlanmıştır.

pH:8.0 100 ml 1.0 M Na₂HPO₄ eklenerek ayarlamıştır.

pH:9.0 100 ml 1.0 M NaHCO₃ eklenerek ayarlamıştır

pH:10.0 100 ml 1.0 M Sodyum sesquikarbonat tamponu (pH:10.0) eklenerek ayarlamıştır.

Besiyeri 10. Amilaz ortamı

Bu ortam amilaz üreten mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılmıştır. [111].

Bileşimi: Nutrient agar 28 gr/L; Nişasta 20 gr/L;

Hazırlanışı: Ortam içerikleri sıcak distile suda çözüldükten sonra 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiş ve 45 °C' ye soğutulularak amilaz ortamı petri kutularına dağıtmıştır.

Besiyeri 11. Selülaz ortamı

Bu ortam selülaz üreten mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılmıştır [112].

Bileşimi: Tripton (Oxoid L 42) 10 gr/L; Maya özütü 5 gr/L; Karboksi metil selüloz (CMC) (Sigma, C-4888) 1 gr/L; NaCl 10 gr/L; Agar % 1,5;

Hazırlanışı: Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmişve 45 °C' ye soğutulularak selülaz ortamı petri kutularına dağıtılmıştır.

Besiyeri 12. Proteaz ortamı

Bu ortam proteaz üreten mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılmıştır. [109, 113].

Bileşimi: Çözünebilir nişasta (Riedel, 18727) 10 gr/L; Pepton 5 gr/L; Maya özütü 5 gr/L; K_2HPO_4 1 gr/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 gr/L; Na_2CO_3 10 gr/L; Skim milk (Oxoid L 31) %0.5; Agar % 1

Hazırlanışı: Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Besiyeri 15' de içeriği verilen süt agarı (Skim milk) da 121°C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 5 dakika sterilize edilmiş, ortam 45 °C' ye kadar soğutulduktan sonra, diğer ortama son konsantrasyon %0.5 olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve aseptik koşullarda petri kutularına dökülmüştür. Ortam katılaştıktan sonra koloidal kazein molekülleri ortama opak bir görünüm kazandırmaktadır.

Besiyeri 13. Ksilanaz ortamı

Bu ortam ksilanaz üreten mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılmıştır [114].

Bileşimi: Pepton 5 gr/L; Maya özütü 1 gr/L; K_2HPO_4 1 gr/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 gr/L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1g/L; Ksilan 5gr/L; Agar 15g/L.

Hazırlanışı: Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiş ve ortam 45 °C' ye kadar soğutulduktan sonra, aseptik koşullarda petri kutularına dökülmüştür.

Besiyeri 14. Fitaz ortamı

Bu ortam fitaz üreten mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılmıştır [115].

Bileşimi: Glikoz 20 gr/L; Na-fitat 4 gr/L; NH_4NO_3 5 gr/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 gr/L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2g/L; KCl 0.5gr/L; $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.01g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g/L; Agar 15g/L.

Hazırlanışı: Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiş ve ortam 45 °C' ye kadar soğutulduktan sonra, aseptik koşullarda petri kutularına dökülmüştür.

Besiyeri 14. Lipaz ortamı

Ortam lipaz üreten mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılmıştır [116].

Bileşimi: Tribütrin 5ml; K₂HPO₄ 3.5gr/L; KH₂PO₄ 1 gr/L; NaCl 2.5 gr/L; MgSO₄ 7H₂O 0.5 gr/L; Agar 15g/L.

Hazırlanışı: Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra, 121 °C’de, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam 45 °C’ ye kadar soğutulduktan sonra, aseptik koşullarda steril petri kutularına dökülmüştür.

Besiyeri 15. Süt Agarı (Skim Milk)

Dehidre Skim milk (Oxoid L31) 10 gr/100 ml oranında distile suda çözülmüş ve 121°C’ de, 1.5 atmosfer basınçta, 5 dakika sterilize edilmiştir. Bu ortam proteaz ortamında ve liyofilize edilecek organizmaların hazırlanmasında kullanılmıştır.

2.3. SDP1 İzolatının Ürettiği Enzimlerin Belirlenmesi

2.3.1. Katı ortamda enzim üretimlerinin belirlenmesi

2.3.1.1. Amilaz üretimi

Gliserol stoktan alınarak nutrient broth’da gece boyu aktive edilen izolat besiyeri 10’ da belirtildiği gibi hazırlanan amilaz ortamlarına, steril koşullarda 3 µl nokta ekim yapılmıştır. 24 saat boyunca 37 °C’de inkübe edilen kültürlerde amilaz üretimi oluşan koloninin üzerine lugol çözeltisi dökülerek belirlenmiştir. Lugol, ortamdaki nişastayı boyayarak koyu mavi bir renk almasını sağlar. Amilaz üreten koloni çevresinde nişastayı hidrolizlemesi sonucunda oluşan açık şeffaf zon pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. (Gerhardt ve diğ., 1981).

2.3.1.2. Selülaz üretimi

Gliserol stoktan alınarak nutrient broth’da gece boyu aktive edilen izolat besiyeri 11’ da belirtildiği gibi hazırlanan selülaz ortamlarına, steril koşullarda 3 µl nokta ekim yapılmıştır . 24, 48 ve 72 saat 37 °C’de inkübe edilen kültürlerde oluşan koloninin üzerine %1’ lik Kongo Kırmızısı damlatılmıştır. Boyanın fazlası 1 M NaCl ile yıkanmış ve koloni çevresinde oluşan açık şeffaf zon pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

2.3.1.2. Ksilanaz üretimi

Gliserol stoktan alınarak nutrient broth'da gece boyu aktive edilen izolat besiyeri 13' da belirtildiği gibi hazırlanan ksilanaz ortamlarına, steril koşullarda 3 µl nokta ekim yapılmıştır. 24 saat 37°C' de inkübe edilen kültürlerde oluşan koloninin üzerine %1' lik Kongo Kırmızısı damlatılmıştır. Boyanın fazlası 1 M NaCl ile yıkanmış ve koloni çevresinde oluşan açık şeffaf zon pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

2.3.1.3. Proteaz üretimi

Gliserol stoktan alınarak nutrient broth'da gece boyu aktive edilen izolat besiyeri 12' da belirtildiği gibi hazırlanan proteaz ortamlarına, steril koşullarda 3 µl nokta ekim yapılmıştır. 24 saat 37 °C'de inkübe edilen kültürlerde koloni çevresinde oluşan açık şeffaf zon pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

2.3.1.4. Fitaz üretimi

Gliserol stoktan alınarak nutrient broth'da gece boyu aktive edilen izolat besiyeri 14' da belirtildiği gibi hazırlanan fitaz ortamlarına, steril koşullarda 3 µl nokta ekim yapılmıştır. 72 saat 37 °C'de inkübe edilen kültürlerde koloni çevresinde oluşan açık şeffaf zon pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

2.3.2. Sıvı ortamda amilaz üretiminin belirlenmesi

Katı ortamda pozitif sonuç veren amilaz, fitaz, ksilanaz ve selüloz enzimleri için uygun sıvı üretim ortamları hazırlanarak izolat SDP1'in bu üretim ortamlarındaki enzim profilleri belirlenmiştir. İçerisinde 5 ml ± 0.1 Nutrient broth ortamı bulunan tüplere, gliserol stoktan alınan organizma 100 µl inokule edilerek, 37°C ± 0.5 sıcaklıkta 24 saat büyütülmüştür. Aktive olan kültürden OD₆₀₀ da başlangıç absorbans değeri 0.06 olacak şekilde, aseptik koşullarda 100 ml üretim besiyeri içeren 500 ml erlenmeyer içerisine inokule edilerek, 37°C ± 0.5 sıcaklıkta, 200 rpm çalkalama hızında 120 saat büyütülmüştür Fermentasyon sonunda hücreler santrifüjlenerek (SIGMA 6K15 model santrifüj; 9000g, 45 dak, 0-4 °C) ortamdan uzaklaştırılmış ve 24, 48 ,72,ve 96 ve 120 saatlerde enzim aktiviteleri kültür üst sıvısı kullanılarak aşağıda verilen yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

Enzim aktiviteleri aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/ml/min)} = \frac{W \times V \times 1000}{M \times V_e \times t}$$

W: Açığa çıkan ürün/kullanılan substrat miktarı, (mg) (OD₅₄₀ / Standart grafikten elde edilen eğim);

M: Maltozun molekül ağırlığı, (342.29648 g/mol);

V_e : Enzim hacmi, (ml); V: Reaksiyon çözeltisi hacmi, (ml);

t: Reaksiyon süresidir (dakika).

2.3.2.1. Amilaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Amilaz aktivitesi Miller (1959) tarafından verilen yöntemle belirlenmiştir [94]. Amilaz aktivitesinin belirlenmesinde, substrat olarak 20mM, pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış 1% (w/v) nişasta çözeltisi kullanılmıştır. 0.1 ml uygun oranlarda seyreltilmiş enzim, 0.9 ml, 20 mM, pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış 1% (w/v) nişasta çözeltisi' ile karıştırılarak 50°C'de 10 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. Nişasta'nın hidrolizi sonucunda oluşan maltoz miktarı dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi (Dubois ve çalışma ark.,1956) ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. İnkübasyon sonucunda örneklerin absorbans değerleri 540 nm'de (BioRad Smart Spec 3000) ölçülmüştür. Enzim aktivitesi standart maltoz grafiği oluşturularak aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır. Bir birim amilaz aktivitesi, nişasta hidrolizi sonunda, 50°C ve pH 7.0'de dakika da 1 µmol maltoz oluşturan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.

2.4. Mikroorganizmanın Taksonomik Karakterizasyonu

İzolatlar SDP1'in kültürel (koloni karakterizasyonu, hareketlilik), mikroskobik (morfolojileri: şekil, boyama özelliği, spor oluşturması, büyüklüğü), fizyolojik (aerobik ya da anerobik olarak üreyebilirliği, optimum üreme sıcaklığı) ve biyokimyasal (şekerleri oksidatif ya da fermentatif tarzda kullanılabilirliği, metabolizmasını aydınlatacak çeşitli biyokimyasal testler), genetik karakterleri, literatürlerde tarafından tanımlanan testlerle tespit edilmiştir [108-111, 113, 116].

2.4.1. Kültürel özelliklerin belirlenmesi

İzolat SDP1'in kültürel özellikleri; nutrient broth ortamlarında aktive edilen izolatlardan nutrient agar ortamlarına ayrı ayrı çizgi ve nokta ekim yapılarak belirlenmiştir [108]. SPD1'in hareketliliği yarı katı nutrient agar ortamına steril iğne öze ile aseptik şartlarda dik ekim yapılarak belirlenmiştir. 24 saat boyunca 37 °C' de inkübe edilen kültürlerde iğne özenin bıraktığı iz üzerindeki üremenin kenarlara dağılımı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

2.4.2. Mikroskopik özelliklerin belirlenmesi

2.4.2.1. Gram boyama

Nutrient broth' ta 24 saat 37°C sıcaklıkta aktive edilen izolat SDP1, steril şartlarda öze ile alınarak ve önceden temizlenmiş lam üzerinde bir damla distile su içerisinde yayılarak kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan bakteriyel film üç kez alevden geçirilerek tespit edilmiş ve soğumaya bırakılmıştır. Hazırlanan örnekler, filtreden geçirilmiş kristal violet ile mikrobiyal film tabakası kaplanacak şekilde 1 dakika etkiye bırakılmıştır.

Fazla boya lamdan süzülerek alınmış ve örnekler gram iyodür (Lugol) çözeltisiyle 1,5 dakika etkiye bırakılmıştır. Fazla lugol lamdan distile su ile yıkanarak alınmış, etil alkolde 10-15 saniye bekletilmiş ve suyla yıkanarak alkol uzaklaştırılmıştır. Örnekler safranin ile 30 saniye etkiye bırakılmış, fazla boya lamdan süzülerek alınmış ve suyla yıkanmıştır. Kurutma kâğıdıyla hafifçe kurulan örnekler havada iyice kuruduktan sonra bakteri morfolojileri Leica DM4000B marka floresans mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Mikroskoba bağlı Leica DFC 420C kamera sistemi ile fotoğrafları çekilmiştir. Bakterilerin boyutları mikroskobun sahip olduğu yazılım kullanılarak belirlenmiştir. Boyanmış olan örneklerde Gram (+) olan mikroorganizmalar koyu mor (menekşe) renk, Gram (-) olanlar ise açık pembe renkte görünüm ile ayırt edilmiştir [109].

2.4.2.2. Endospor oluşumunun belirlenmesi

Nutrient broth' ta 24 saat 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılan organizmalar endospor ortamına steril öze ile çizgi ekim yapılmış ve 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakteriler, steril şartlarda öze ile alınmış ve önceden temizlenmiş lam üzerinde bir damla distile su içerisinde yayılarak kurumaya

bırakılmıştır. Hazırlanan bakteriyel film üç kez alevden geçirilerek tespit edilmiştir ve soğumaya bırakılmıştır. Örnekler malaşit yeşili ile alevde 5 dakika etkiye bırakılmıştır ve buharlaştıkça boya ilave edilmiştir. Distile su ile yıkanan örnekler 30 saniye safranin ile boyanmış ve distile suyla tekrar yıkanıp havada kuruttuktan sonra bakteri sporlarının morfolojileri, Leica DM4000B marka floresans mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Mikroskopa bağlı Leica DFC 420C kamera sistemi ile fotoğrafları çekilmiştir. Bakteri sporlarının boyutları sahip olduğu yazılım kullanılarak belirlenmiştir. Boyama sonucunda; sporlar yeşil, vejetatif hücreler pembeye boyanmış olarak görüntülenmiştir [109].

2.4.3. Fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi

İzolat SDP1'in fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri Nielsen ve diğ., (1995) ve Bergey's (1986) tarafından verilen yöntemlere göre yapılmıştır Fenotipik özelliklerin belirlenmesinde API hazır tanı kitleri kullanılarak deneyler tekrarlanmıştır. API 50 CH galerisi (Biomérieux) karbohidrat kullanım testleri için kullanılmıştır. Ayrıca VITEK 2 sistemi ile de deneyler tekrar edilmiştir.

2.4.3.1. Katalaz testi

Nutrient Broth' ta 24 saatte aktif hale getirilen SDP1 nutrient agara çizgi ekim yapılmış ve 24 saat 37°C inkübasyona bırakılmıştır. [108]

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

2.4.3.2. Oksidaz testi

Nutrient broth' ta 24 saatte aktif hale getirilen organizmadan nutrient agara çizgi ekim yapılmıştır. 24 saat 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır [111]. Oksidaz testi için taze hazırlanan %1'lik tetrametil p-fenilendiamin çözeltisinin birkaç damlasıyla filtre kağıdı nemlendirilmiştir. Platin öze ile aktivasyon ortamı yüzeyinden alınan koloni nemlendirilen kâğıda sürülmüştür. Koloninin kâğıda sürüldüğü kısımda 30 saniye içerisinde mor rengin oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bu test sitokrom oksidaz varlığının belirlenmesinde kullanılmıştır.

2.4.3.3. Farklı NaCl içeren ortamlarda büyümenin belirlenmesi

Gliserol stoktan alınarak nutrient broth'da 24 saat aktive edilen kültürlerden, Besiyeri 8'de belirtilen içinde %2, %5, %7, %10, %12 NaCl' lü agar içeren petri kutularına steril öze ile çizgi ekimi yapılmıştır. Kültürler 72 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ortamlarda gözlemlenen büyümenin varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir [109].

2.4.3.4. Maksimum ve minimum sıcaklıklarda büyümenin belirlenmesi

Gliserol stoktan alınarak nutrient broth'da 24 saat aktive edilen kültürlerden, nutrient agarlı petri kutularına steril öze çizgi ekimi ile inokulasyon yapılmıştır. Petri kapları farklı sıcaklıklarda 72 saat gözlenmiştir. Agarda büyümenin varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir [108].

2.4.3.5. Farklı pH'larda büyümenin belirlenmesi

pH aralığının belirlenmesi için gliserol stoktan alınarak nutrient broth'da 24 saat aktive edilen kültürlerden, besiyeri 9'da belirtildiği gibi hazırlanan farklı pH'daki ortamlara steril öze ile çizgi ekimleri yapılmıştır. 5 gün boyunca 37°C'de inkübe edilen ortamlarda büyümenin varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Nielsen ve diğ., 1995).

2.4.3.6. Bakterinin API sistemi ile tanınması

Biomérieux firması tarafından üretilen API sistemi farklı mikroorganizmaların tanınması, karbohidrat profillerin belirlenmesi, bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için geliştirilmiştir. API sisteminde *Bacillus* izolatlarının hızlı ve doğru tanımlanması için API20E ve API 50CHB stripleri kullanılmıştır. Bu striplerden alınan sonuçlar bir matriks formunda bilgisayarda yazılımda işlenerek mikroorganizmanın tanımlanması yapılmıştır. API sisteminde elde edilen sonuçlar klasik testere kıyasla daha tekrar edilebilir özelliktedir.

API 50 CHB galerisi organizmanın karbohidrat kullanım profilinin belirlenmesi ve karbohidrat metabolizması hakkında bilgi sahibi için kullanılmıştır. Sadece in vitro tanılamada kullanılan API 50 CHB şeritleri, aynı zamanda mikroorganizmaların cins seviyesinde tanınması içinde kullanılmaktadır. API 50 CHB galerisi içinde her birinde

bir miktar dehidre halde 49 farklı karbohidrat türevi içeren yani 49 farklı test içeren küpül bulunmaktadır. Bu substratlar, değişik biyokimyasal yollarla metabolize edilirler;

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

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

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

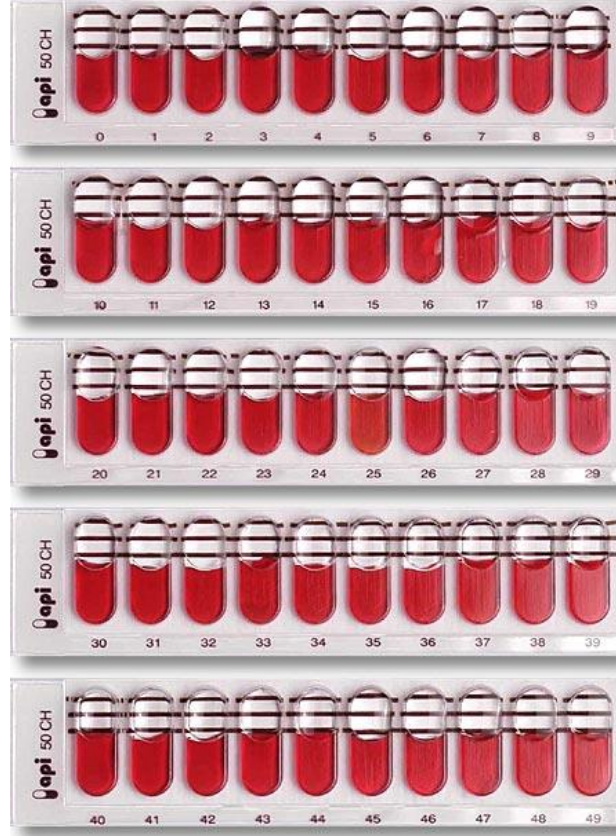
Reaksiyon sonucunda, küpürlerden elde edilen pozitif ve negatif olarak tanımlanan sonuçlar mikroorganizmaların karbohidrat metabolizması hakkında fikir verir. API şeritlerinde ilk küpül negatif kontrol olarak kullanıldığından substrat içermez. API şeritlerinin kompozisyonu Tablo 2.1.'de verilmiştir. API şeritlerinin görüntüsü de Şekil 2.1.'de verilmiştir.

API 20E enterik bakterilerin identifikasyonu için kullanılmaktadır. API 20E stripleri 12 test içermektedir. Son 8 küpür 50CHBde bulunan karbohidrat substratlarının duplikasyonlarıdır. Bu yüzden son 8 küpüre inokulasyon yapılmaz. Strip içerikleri Tablo 2.2.de verilmiştir.

SDPI NA içeren petri platerinde gece boyu büyütüldükten sonra hücreler API seti içerisindeki steril normal tuz solüsyonuna öze ile alınmış, vorteks ile iyice karıştırılmış ve 2 farklı süspansiyon hazırlanması için kullanılmıştır: i) API 20E stripi için 4ml strile normal tuz solüsyonu içinde McFarland değeri 3 olacak şekilde organizma aşılır. McFarland 3.0 değeri yaklaşık olarak 9×10^8 organizmaya denk gelmektedir, ii) API 50CHB stripleri içinse fosfat tamponu (pH 7.5) içinde (g/L) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2; maya özütü, 0.5; tripton, 1; fenol kırmızısı, 0.18; mineral Cohen-Bazire bazı 10 ml içermektedir. API 50 CHB/E ortamı steril edildikten sonra McFarland 3.0 değeri olacak şekilde organizmalar eklenmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra aseptik koşullarda steril uçlarla API şeritlerine küpül kısmı taşmayacak şekilde seri olarak eklenmiştir. 30 "C'de 24 saatlik ve 48 saatlik inkübasyondan sonra her bir küpüldeki rengi, ilk küpüldeki renk ile karşılaştırılarak karbohidrat kullanımının pozitif ya da negatif olduğu şeklinde

değerlendirmiştir.. API20E testinde bulunan ilk 12 küpüle steril ortamda inokulasyon yapılmışve stripler 30 "C'de 48 saat inkübe edildikten sonrokunmuştur.

Daha sonra sonuçlar firma tarafından sağlanan yazılıma girilerek analiz edilmiştir.



Şekil 2.1. API 50CHB stripi

Tablo 2.1. API 50CHB Kiti içinde bulunan farklı karbohidratların listesi

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

Tablo 2.2. API 20E Strip

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA |

2.4.4. Kemotaksonomik özelliklerin belirlenmesi

2.4.4.1. Hücresel yağ asitlerinin analizi

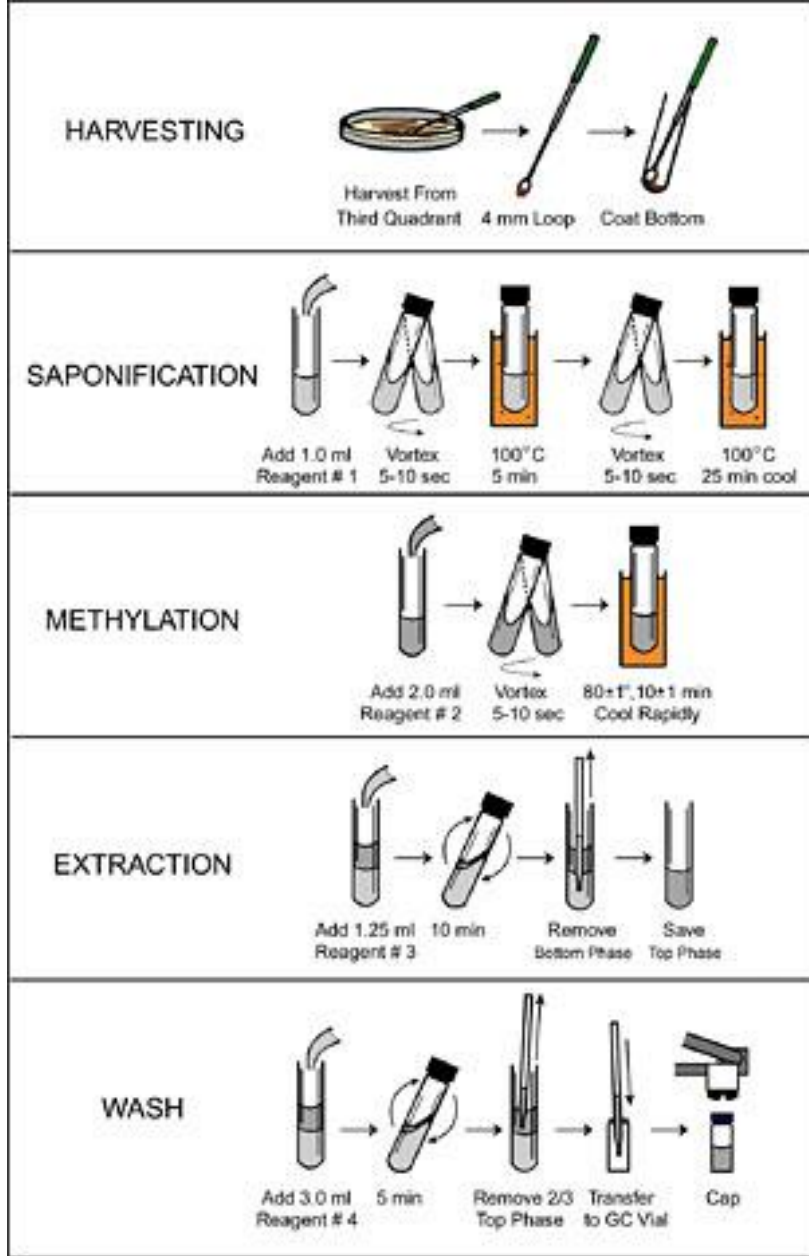
İzolat SDP1 ve referans soy *B. subtilis* DSM 10^T, *B. mojavensis* CCTCC AB96001 ve *B. atrophaeus* CCTCC AB 95007^T arasındaki taksonomik benzerlik hücresel yağ asitlerinin analizi ile saptanmıştır. Hücresel yağ asit profilleri, Sherlock-MIDI Otomatik Mikrobiyal Tanılama Sisteminde belirtilen protokol kullanılarak (Sherlock Microbial Identification System MIDI Inc., Newark) belirlenmiştir. İzolat SDP1, hücresel yağ asidi analizi için Nutrient Broth ortamında 24 saat aktive edilmiştir. 24 saatlik kültürlerden TSA ortamına steril öze ile çizgi ekimle (Quadrant ekim-dörtlü ekim) inokulasyonu yapılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra steril öze ile TSA' lı ortamda 3. bölgeden 4 mm' lik steril öze ile dikkatli bir şekilde aseptik şartlarda ~20 mg hücre toplanmıştır. Yağ asidi analizi için dört farklı aşama uygulanmış ve aşamalar aşağıda detaylı olarak anlatılmış ve Şekil 2.2.'de verilmiştir.

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

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

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

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



Şekil 2.2. FAME analiz şeması

Analizler Agilent marka 6890C Network Gaz kromatografisi sistemi ve üzerinde veritabanı olan Sherlock sistemi ile yapılmıştır (Şekil 2.3.). 1200A kodlu yağ asidi standardı ile kalibrasyonu yapılan cihaza örnekler verilmiş ve yağ asidi profilleri elde edilmiştir. Daha sonra yağ asitlerinin spektrumunda gelme zamanları veritabanında aynı yöntem ile hazırlanmış diğer organizmaların verileri ile karşılaştırılarak bir analiz raporu elde edilmiştir. Bu rapor örnekteki yağ asidi yüzdeleri ve organizmanın taksonomik bilgileri bulunmaktadır.



Şekil 2.3. Agilent 6890C Network Gaz kromatografisi sistemi

2.4.5. Genotipik Özelliklerin belirlenmesi

İzolat SDP1'nin 16S rRNA dizileri ve % mol GC oranları belirlenerek tür düzeyinde tanılanmıştır.

2.4.5.1. Genomik DNA izolasyonu

Gliserol stokdan alınarak NB besiyerinde gece boyu büyütülen izolat SDP1'nin genomik DNA' ları "Invitrogen Pure Link Genomic DNA kiti" (Şekil 2.4.) ile aşağıdaki prosedüre göre izole edilmişlerdir.

- Sıvı bakteri kültürü (1.5 ml) 4500 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüş, üst sıvılar uzaklaştırılmıştır.
- 20 mg/ml lysozyme içeren Lysozyme Digestion tamponu hazırlanıp bakteri pelleti 180 µl Lysozyme Digestion tamponu ile resüspanse edilmiş ve 37°C su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Karışıma 20 µl Proteinaz K eklenip vortekslenerek karıştırılmış ve üzerine 200 µl Genomic Lysis/Binding buffer eklenmiş karıştırıldıktan sonra 30 dakika 55°C su banyosunda inkübe edilmiştir.

- Lizatın üzerine 200 µl %96 – 100 lük etanol eklenip 5 saniye boyunca vorteksenerek homojen bir karışım oluşması sağlanmıştır.
- Lizat PureLink spin column' a yüklenmiş ve 10.000 g hızında 1 dakika santrifüj edilerek genomik DNA' nın kolona bağlanması sağlanmıştır.
- Kolon 500 µl birinci yıkama tamponu eklenmiş ve kolon 10.000 g hızında 1 dakika santrifüjlenerek kolonun birinci yıkaması, sonrasında ise 500 µl ikinci yıkama tamponu eklenip 10.000 g de 3 dakika santrifüjlenerek kolonun ikinci yıkaması gerçekleştirilmiştir.
- Yıkama işlemlerinden sonra kolon 1.5 ml steril mikro santrifüj tüpüne yerleştirilmiş üzerine 40 µl elüsyon tamponu konularak 1 dakika oda sıcaklığından beklenmiş ve sonrasında maksimum hızda (~14.000 rpm) 3 dakika santrifüj edilerek genomik DNA elde edilmiştir.
- Elde edilen genomik DNA' nın saflık ve miktarı NanoDrop (Thermo Scientific) spektrofotometre kullanılarak OD260/280 da belirlenmiştir.



Şekil 2.4. Invitrogen Pure Link Genomic DNA kiti [117]ve Nanodrop cihazı[118]

Genomik DNA izolasyonu için ikinci bir yöntem olarak DNazol®Direct (Molecular Research Center Inc,) kullanılmıştır. Bunun için gliserol stokdan alınarak 5 mL NB besiyerinde 37 °C'de gece boyu inkübe edilen organizmadan eppendorfa 1.5 mL alınarak 7000 dev/dak 5 dakika santrifüj edilmiştir.. Üst sıvı atılarak hücre pelletine 0.1 mL DNazol®Direct (Molecular Research Center Inc,) ilave edildikten sonra 80°C 15 dakika bekletilerek genomik DNA elde edilmiştir. Genomik DNA izolasyonu agaroz jel ile kontrol edilmiştir.

2.4.5.2. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin ayırımı, tanımlanması ve saflaştırılması için yaygın olarak kullanılan ve elektriksel bir alanda, ortamda çözülmüş moleküllerin elektrik yükleri, molekül büyüklükleri ve fiziksel özelliklerine göre göç etmeleri prensibine dayanan moleküler bir yöntemdir. Eğer elektrik alanın uygulandığı jel nötral pH'da ise DNA'nın negatif yüklü fosfat grupları anoda doğru hareket eder. Agaroz jel elektroforez yöntemi basit ve hızlı bir yöntemdir ve diğer yöntemleri ile ayıramayan DNA'yı ayırmamızı sağlar. DNA'nın jel üstündeki konumu DNA'nın boşluklarına girerek düşük konsantrasyonda floresan verme özelliğine sahip etidyum bromür boyasının kullanılması ile mümkün olmaktadır.

% 1'lik jel hazırlamak için; 0.50 gr agaroz (Sigma, A5093) 50 ml 1X TAE agaroz elektroforez tamponuna eklenmiş ve mikro dalga fırında çözülmüştür. Homojen karışım etidyum bromürün kimyasal yapısı bozulmaması için 50-60 °C' ye kadar soğutularak son konsantrasyon 0.15 µg/mL olacak şekilde 10mg/ml' lik etidyum bromürden 1,5 µl eklenmiştir. Jel kasete dökülerek 30-60 dakika süre ile donması beklenmiştir. Taraklar çıkarılmış ve jel içinde 1X TAE bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyulara yüklenmiş kuyulardan birine istenilen boyutta seçilen bir markör yüklenmiştir. Tankın kapağı DNA anoda yürüyecek şekilde kapatıldıktan sonra 5-10 V/cm voltaj uygulanmıştır. Yaklaşık 40 dakika sonra jel çıkarılarak gel görüntüleme sisteminde UV ışık altında görüntüsü alınmıştır.

2.4.5.3. 16s rDNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması

SDP1 izolatına ait 16S rDNA dizisinin belirlenmesinde, universal primerler 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve 1525R 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile 16SrDNA geni çoğaltılmıştır. Reaksiyon 400 ng kromozomal DNA ve her bir primerden 25 pmol/µl konsantrasyonda katılarak toplam 50 µl hacimde gerçekleşmiştir. Reaksiyon döngüsü Tablo 2-3.'de verilmiştir. Elde edilen PZR ürünü %1'lik agaroz gel ile görüntülenmiş DNA miktarları Nanodrop ile kontrol edilmiştir.

PCR koşulları;

| | |
|-----------------------------|---------|
| 10x PCR tampon | 5.0 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 5.0 µl |
| Primer 27F (10 pmol/µl) | 2.5 µl |
| Primer 1525R (10 pmol/µl) | 2.5 µl |
| Genomik DNA (1/10 dilüsyon) | 2.0 µl |
| dNTP mix (102 mM) | 5 µl |
| Taq DNA Polymerase (5U/µl) | 0.5 µl |
| dH ₂ O | 27.5 µl |

Tablo 2.3. 16s rDNA için PZR döngüsü

| Döngü Sayısı | Sıcaklık (°C) | Süre (dakika) |
|--------------|---------------|---------------|
| 1 | 96 | 5 |
| 35 | 96 | 1 |
| | 52 | 1 |
| | 72 | 3 |
| 1 | 72 | 10 |

2.4.5.4. PZR için ürünlerin saflaştırılması

PZR ürünleri (~1500bp 16S rRNA geni) fazla tuz, dNTP vb. malzemelerden temizlenmesi ve böylece dizi analizinde kullanılabilir hale gelmesi için Invitrogen PureLink PCR Purification Kit kullanılarak aşağıdaki protokole göre saflaştırılmıştır.

- PZR ürününün üzerine ürün hacminin 4 katı hacminde PureLink Binding Buffer solüsyonu eklenir ve iyice karıştırılır.
- Hazırlanan karışım PureLink Spin Column kolonuna yüklenir ve 10.000g de 1 dakika santrifüj edilerek alta geçen sıvı atılır. DNA kolonda tutunmuş haldedir.
- Kolona 650 µl Etanol içeren yıkama tamponu konur ve 10.000g de 1 dakika santrifüjlenerek alta geçen sıvı atılır.

- Yıkama tamponunun tamamını kolondan uzaklaştırmak için, kolon 3 dakika boyunca maksimum hızda tekrar santrifüj edilir ve alta geçen sıvı atılır.
- Kolon steril bir mikro santrifüj tüpüne yerleştirilir ve kolonun tam ortasına 50µl elüsyon tamponu koyulur.
- Elüsyon tamponu eklenmiş kolon oda sıcaklığında 1 dakika bekletilir ve sonrasında 2 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edilir.
- Kolon atılır steril tüpe geçen sıvı saflaştırılmış PZR ürününü içermektedir. Ürün dizi için kullanılmak üzere -20 °C de saklanır.

2.4.5.5. 16S rRNA gen dizisinin belirlenmesi

27F ve 1525R universal primerleri ile çoğaltılan ve sonrasında Invitrogen PureLink PCR Purification Kit kullanılarak saflaştırılan 16S rDNA geninin dizilenmesi sırasında Tablo 2.4.'de verilen primer seti kullanılmıştır.

Tablo 2.4. Dizileme reaksiyonu için kullanılan primerler

| | |
|--------------|-----------------------------|
| 27F | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| 515R | GWATTACCGCGGCKGCTG |
| 530F | GTGCCAGCMGCCGCGGTAA |
| 1100R | AGGGTTGCGCTCGTTG |
| 357F | ACTCCTACGGGAGGCAG |
| 803F | ATTAGATACCCTGGTAG |
| 1525R | AAGGAGGTGATCCAGCCGCA |

Dizi analizi için kurulan PZR reaksiyonu Beckman Coulter Quick Start Kit kullanılarak aşağıdaki verildiği şekilde toplam 20 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Her primer için ayrı ayrı reaksiyon hazırlanması gerekmektedir. PZR döngüsü Tablo 2.5.'de verilmiştir.

Dizi analizi PZR Reaksiyon Koşulları

| | |
|------------------------------------|------------|
| DNA kalıbı(100ng) | 0.5-10 µl |
| Sekans Primeri(1.6pmol/µl) | 2.0 µl |
| DCTS Quick Start Master Mix | 8.0 µl |
| dH ₂ O (son hacmi 20µl) | 0 - 9.5 µl |

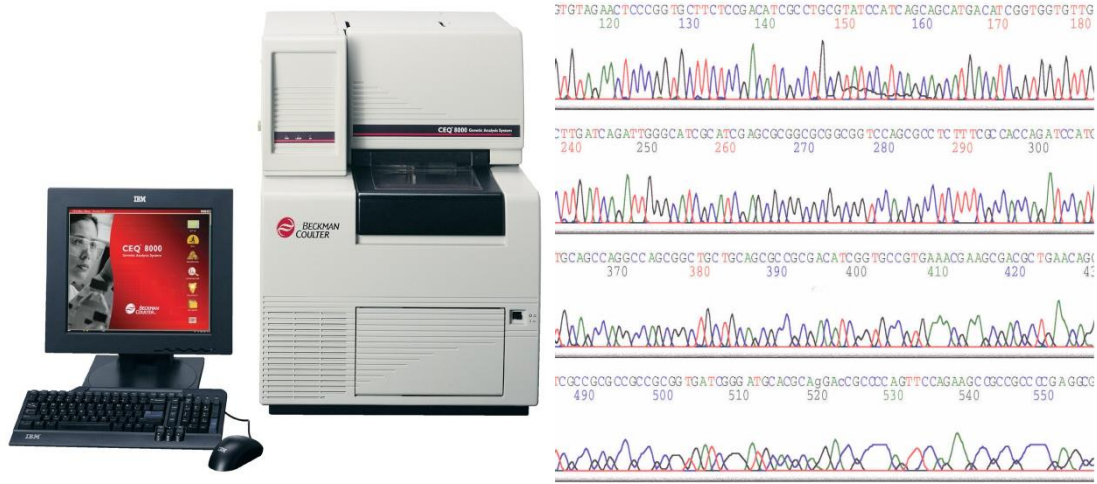
Tablo 2.5. Dizileme reaksiyonu için PZR döngüsü

| Döngü Sayısı | Sıcaklık (°C) | Süre (saniye) |
|--------------|---------------|---------------|
| 1 | 96 | 20 |
| 30 | 96 | 20 |
| | 50 | 20 |
| | 60 | 240 |
| 1 | 4 | süresiz |

Yukarıda belirtilen sıcaklık sürelerde gerçekleştirilen dizi analizi PZR ürünleri ışıktan korunarak dizi analizi için etanol çöktürme işlemine alınmıştır.

- Her bir örnek için 0.5 ml mikro santrifüj tüpü ayrılıp etiketlenmiştir.
- Her reaksiyon için taze olarak hazırlanmış durdurma solüsyonundan (2 µl 3M Sodyum Asetat pH:5.2, 2 µl 100mM Na₂-EDTA, 1µl 20 mg/ml Glikojen) 5 µl eklenerek karıştırılmıştır.
- Her reaksiyon karışımı kendisi için etiketlenmiş 0.5 ml santrifüj tüplerine aktarılmış ve üzerlerine 60 µl soğuk (-20 °C) %96-100 lük etanol eklenip karıştırılarak 4°C de 14.000 rpm de 15 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrasında pellet görülür haldedir; üst sıvı pipet ucu ile pellete dokunmamaya dikkat edilerek otomatik pipet ile dikkatlice alınır.
- Pellet iki kere 200 µl soğuk %70' lik etanol ile yıkanır. Her yıkama sonrasında 4°C de 14.000 rpm de en az 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılır.
- İkinci yıkamadan sonra pellet vakum kurutucu da kurutulur.

- Kurutulan DNA pelleti 40 µl Sample Loading Solution (SLS) ile süspansen edilir ve Beckman Coulter CEQ 8800 cihazının örnek tablalarına yüklenir. Örneklerin yüzeyleri mineral yağ ile kapatılır. Örnek tablaları cihaza yüklenir ve dizi analizi sonuçları cihazdan alınır (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Beckman Coulter CEQ 8800 genetik analiz sistemi ve kromatogram örneği [119]

Cihazdan alınan ham data BioEdit programı ve Clustal Multiple Alignment Program (Clustal W 1.8)[120] kullanılarak düzenlenmiş, birleştirilerek sonuç (consensus) dizisine ulaşılmıştır. Benzerlik araştırması (GenBank/EMBL/DDBJ) veritabanlarında bulunan Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) programı [121] kullanılarak ve referans veritabanları kullanılarak yapılmıştır. [122].

2.4.5.6. Filogenetik ağacın oluşturulması

İzolat SDP1'in filogenetik pozisyonunu belirlemek amacı ile veritabanlarında bulunan referans *Bacillus* türlerine ait sekans bilgileri fasta formatında kaydedilmiştir. 16S rDNA dizileri Clustal Multiple Alignment Program (Clustal W 1.8)[120] ile karşılaştırılmış ve analiz sonucunda filogenetik ağaç MEGA version 5 yazılımı kullanılarak hazırlanmıştır[123]. Filogenetik ağaçtaki uzaklıklar Kimura 2-parametre modeline göre hesaplanmıştır. Kümeler (cluster) neighbour-joining and maximum-parsimony and maximum likelihood metodlarına dayanarak hesaplanmıştır. Ağaç topolojisi analiz yazılımı tarafından bootstrap metodu kullanılarak 1000 kere tekrar edilerek oluşturulmuştur [124].

Filogenetik çalışmada kullanılan 16S rRNA dizilerinin Genbank kabul numaraları aşağıda verilmiştir. Analizde *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366^T grup dışı organizma olarak kullanılmıştır.

B. mojavensis DSM 9205^T (AB021191); *B. subtilis subs.spizizenii* , AF074970; *B. subtilis subs.subtilis* CECT 39^T (AJ276351); *B. subtilis subsp. subtilis str. 168* (AL009126); *B. velezensis* CR-502^T (AY603658); *B.vallismortis* DSM 11031^T (AB021198); *B. fastidious* DSM 91^T (X60605); *B. atropheus* DSM 7264^T (AB021181); *B. licheniformis* DSM 13^T (X68416); *B. sonorensis* DSM 13779^T (AF302118); *B. pumilus* DSM27^T (AY456263); *B. aquimaris* JCM 11545^T (AF483625); *B. marisflavi* JCM 11544^T (AF483624); *B. fastidious* DSM 91^T (X60615); *B. halmapalus* DSM 8723^T(X76447); *B.luciniferensis* LMG 18422^T (AJ419629); *B.pseudomycoides* DSM 12442^T (AF013121); *B.thuringiensis* ATCC 10792^T (AF290545); *B.cereus* IAM 12605^T (D16266); *B. mycoides* DSM 2048^T (X55061); *B. weihenstephanensis* DSM 11821^T (AB021199); *B. smithii* DSM 15084^T (X60643); *G. thermoleovorans* DSM 5366^T (Z26923).

2.4.5.7. Guanin+sitozin (% G+C) oranının ve T_m değerinin belirlenmesi

%G+C Mol değerinin belirlenmesi de mikroorganizmanın cins düzeyinde sınıflandırılmasında kullanılan bir analiz yöntemidir. Bunun için öncelikle 2.4.5.1. de belirtilen genomik DNA izolasyonu yöntemi kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Genomik DNA'nın saflık ve konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak OD_{260/280} oranı ölçülerek belirlenmiştir. İzolat SDP1'in genomik DNA'sının erime sıcaklığı T_m değeri Beckman Coulter DU 800 UV/Visible Spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. İzolat SDP1'in %G+C Mol değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%G+C = 2,44 *(T_m - 53,9)$$

%G+C mol değerlerinin hesaplanmasında referans organizmalar kullanılarak sapma değerleri de belirlenmiştir.

2.5. Çalkalamalı Kültürde Enzim Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Katı ve sıvı besiyerinde yapılan deneyler sonucunda, *Bacillus subtilis* SDP1'den amilaz üretiminin optimizasyonu çalkalamalı kültürde laboratuvar ölçeğinde

gerçekleştirilmiş. Basit ve kompleks karbon kaynaklarının, nitrojen kaynakları ve onların farklı konsantrasyonlarının, sıcaklık, pH v.b farklı üretim parametrelerinin amilaz üretimine etkisi incelenmiştir. Amilaz üretimi, 100 ml ortam içeren 500 ml' lik erlenmeyerler içerisinde, 37°C de ve 200 rpm çalkalama hızında 48 saat büyütülmesi ile elde edilmiştir.

2.5.1. Farklı karbon kaynaklarının SDP1 amilaz üretimi üzerine etkisi

Farklı karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi incelemek amacı ile, ilk olarak 11 farklı karbon kaynağı (maltoz, glikoz, galaktoz, laktoz, fruktoz, sükroz, arabinoz, nişasta, ksiloz, rafinoz ve dekstran) kullanılmış, ancak ksiloz, rafinoz ve dekstran varlığında hiç aktivite gözlemlenmediği için, daha sonra ki denemelere 8 farklı karbon kaynağı ile devam edilmiştir. Bu amaçla %1 oranında farklı karbon kaynakları, %1.0 et özütü, %0.05 CaCl₂, and % 0.05MgSO₄.7H₂O içeren üretim ortamına ilave edilmiştir. Daha sonra elimizde bulunan ticari nişastadan farklı olarak mısır ve buğday nişastalarının da amilaz enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Farklı saatlerde üretim ortamlarından alınan örnekler diyaliz edilerek amilaz aktiviteleri, 2.3.2.1 bölümünde verilen aktivite tayin yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

2.5.2. Farklı azot kaynaklarının SDP1 amilaz üretimi üzerine etkisi

Farklı organik ve inorganik nitrojen kaynaklarının (pepton, et özütü, maya özütü, amonyum nitrat, amonyum sulfat, amonyum karbonat, amonyum klorür ve sodyum nitrat) ve onların farklı kombinasyonlarının α -amilaz üretimi üzerindeki etkileri test edilmiştir. Nitrojen kaynakları besiyeri ortamına son konsantrasyon %1 (w/v) olacak şekilde eklenmiştir. En iyi nitrojen kaynağı olarak belirlenen maya özütünün de farklı konsantrasyonlardaki (son konsantrasyon %0,5-5 aralığında olacak şekilde) etkisi incelenmiştir.

2.5.3. Sıcaklığın SDP1 α - amylase üretimi üzerine etkisi

İnkübasyon sıcaklığının, SDP1 α - amylase üretimi üzerindeki etkisi incelemek amacıyla 30 ile 50°C arasında değişen sıcaklıklarında büyüme incelenmiştir. Farklı sıcaklıklarda, 48 saat sonunda amilaz aktivitesi 2.3.2.1.'de belirtilen amilaz aktivite tayin yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

2.6. SDP1 Amilaz Enziminin Karakterizasyonu

2.6.1. pH'nın enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi

pH'nın α -amilaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için amilaz aktivitesi pH 3.0-10.0 aralığındaki farklı tampon sistemleri kullanarak belirlenmiştir. pH 3.0–4.0 için 20 mM glisin-HCl tamponu; pH 5.0–6.0 için 20 mM asetat tamponu; pH7.0–8.0 için 20 mM Tris-HCl tamponu; pH9.0–10 için 20mM glisin–NaOH tampon sistemleri kullanılmıştır. En yüksek aktivite gösteren pH değeri 100 olarak kabul edilerek diğer değerler bu değerle karşılaştırarak sonuçlar bağıl aktivite olarak verilmiştir.

pH kararlılığı çalışmalarında enzim farklı tampon sistemleri ile karıştırılarak oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, örneklerin aktivitesi 2.3.2.1.'de belirtilen amilaz aktivite tayin yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. İnkübasyon öncesi aktivite %100 olarak kabul edilerek, % kalan aktivite hesaplanmıştır.

2.6.2. Sıcaklığın enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi

Sıcaklığın α -amilaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için, amilaz aktivitesi 20°C ile 90°C arasında değişen farklı sıcaklık değerlerinde çalışılmıştır. En yüksek aktivitenin görüldüğü sıcaklıktaki aktivite değeri 100 kabul edilerek, diğer değerler en yüksek değere göre bağıl olarak hesaplanmıştır.

SDP1 α -amilaz enziminin termal kararlılığın belirlenmesi amacıyla enzim örnekleri 10°C ile 70°C arasında değişen sıcaklık değerlerinde su banyosunda bekletilmiş, farklı zaman aralıklarında örnekler alınarak buzda bekletilmiş ve sonrasında kalan aktivite, 2.3.2.1.'de belirtilen amilaz aktivite tayin yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. İnkübasyon öncesi aktivite %100 kabul edilerek, % kalan aktivite hesaplanmıştır.

2.6.3. Metallerin ve denature ajanların α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Metal iyonlarının α -amilaz aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacı ile, enzim farklı metal iyonları (CaCl₂, ZnCl₂, FeCl₃, CuCl₂, NiCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CoCl₂ ve NaCl) ile son konsantrasyon 5mM olacak şekilde 30 dakika inkübe edildikten sonra aktivite 2.3.2.1.'de belirtilen amilaz aktivite tayin yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Metal iyonu bulunmayan örneğin aktivitesi %100 kabul edilerek bağıl aktivite hesaplanmıştır.

Triton X-100, Tween-20, Tween-80, SDS gibi deterjanların, enzim aktivitesi üzerine etkileri belirlemek amacı ile enzim %5 (v/v) konsantrasyonların da Triton X-100, Tween-20, Tween-80 ile %1 (v/v) konsantrasyonunda SDS ile 30 dakika süre inkübe edilmiştir.

Amino asit inhibitörlerinin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelemek amacı ile, enzim 5mM (v/v) konsantrasyonunda fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) ve 5mM konsantrasyonunda etilen daimin tetra asetik asit (EDTA) ile 30 dakika inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası aktiviteler 2.3.2.1 de verilen yöntem kullanılarak belirlenmiş, deterjan veya inhibitör yokluğunda ki enzim aktivitesi %100 olarak alınarak, kalan aktivite hesaplanmıştır.

2.6.4. Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve zimogram analizi

Enzimin moleküler ağırlığı ve enzim fraksiyonuna ait aktivitenin (zimogram) analizi için SDS-PAGE jel ve Nativ jel sistemlerinden yararlanılmıştır [125].

SDS-PAGE elektroforezi için:

SDS-PAGE-Jelinin hazırlanması:

Ayrırma Jeli (%12w/v)

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

Kimyasallar sırası ile cam bir beherde hazırlanmıştır. Toplamı 5 ml olan jel polimerleşme başlamadan önce çok fazla zaman harcamadan hazırlanan kasete dökülmüştür. Jelin üst kısmı izopropil alkol ile düzgünleştirilmiştir ve 20-30 dakika içerisinde jelin donması beklenmiştir.

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

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

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

Örneklerin hazırlanması:

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

SDS-PAGE elektroforez, %5 (w/v) yükleme jeli ve % 12 (w/v) ayırıcı jel kullanılarak Laemmli (1970) tarafından verilen metoda göre 150 V'da, 100 dakika sürede, BioRad Mini Protean marka elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrası, protein bantları, comassie brillant blue R-250 ile boyanmıştır. Enzimin molekül ağırlıkları boyutları 4-250kDa arasında değişen 2 renkli sekiz mavi bant içeren SeeBlue® Plus2 (prestained) belirteç (marker) kullanarak belirlenmiştir.

Zimogram analizi için :

SDS-PAGE elektroforezi sonrasında, jel boyanmadan önce %0.25 lik Triton X-100 çözeltisinde bir saat süre ile inkübasyona bırakılarak SDS'in uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra jel 0,1M fosfat tampon içine alınarak 1 saat inkübe edilmiş ve

daha sonra jelin nişasta ile kaplanması için 0.1 M tampon içerisinde çözölen %1'lik nişasta çözeltisinde +4°C de 1 saat inkübe edilmiştir. Enzim aktivitesinin belirlenmesi için nişasta ile kaplanmış jel 50 °C 'de 2 saat inkübe edildikten sonra jelin üstü Lugol solüsyonu ile kaplanmıştır. Jel üzerinde oluşan berrak zon, amilaz aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmiştir.

2.6.5. İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile nişasta hidroliz ürünlerinin belirlenmesi

İnce tabaka kromatografisi (TLC) çözölebilir nişastanın hidrolitik ürünlerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

TLC karışımların ayrılması için kullanılan bir tekniktir. İnce tabaka kromatografisi, ince bir tabaka ile kaplı, cam, plastik ya da alüminyum folyo, bir levha üzerinde genellikle, silika jel, alüminyum oksit, ya da selüloz gibi bir absorban malzeme ile kaplanır. Bu absorban içeren katman durağan faz olarak adlandırılır. Sıvı faz ise, saflaştırılması istenen karışımın, içinde çözöndüğü kapiller etki ile çekilebilen uygun bir çözöcü veya çözöcü karışımıdır.

İnce tabaka kromatografisinde molekülün jeldeki hareketi genellikle aşağıdan yukarıya doğru yükselen yöntem ile gerçekleştirilir. Bunun için TLC plakalarının yerleştirileceği donanım değişik boyutlar ve şekilde olabilir. TLC tankı içerisine konulacak solvent sistemi ile atmosfer doygunluğunun sağlanabilmesi için kapağının kapalı olması gerekir. Buharlaşıma polariteyi değiştireceğinden kapağın kapalı tutulması önemlidir. Yürütme işlemi tamamlanmış tabakalar, genellikle havada, infrared ışık altında veya fırınlarında kurutulur.

İnce tabaka kromatografisinde, örneğın görünmesini sağlayan çözeltiiler kullanılacak kromatografi tipine göre tercih edilir. Bu belirteçlerin birçoğu korozif veya zehirli olduğı için çeker ocak altında püskürtölmeleri gerekmektedir. Çözeltiilerin TLC plakaları üzerinde düzgün olarak yayılabilmeleri için püskürtölerek uygulanması en başarılı sonucu vermektedir. Daha sonra belirteç sıkılan plakalar yine belirteçlerin özelliklerine göre hemen veya fırında farklı sıcaklıklarda bekletilerek görünür hale gelmektedirler.

Bu çalışıma da ince tabaka kromatografisi Hmidet ve ark. (2008) belirttiğı yöntem kullanılarak belirlenmiştir[126]. Enzim 50°C' de 20 mM fosfat tamponu (pH 7.0) içinde çözölmüş %1'lik nişasta ile inkübe edilmiş ve farklı zaman aralıklarında (0-24 saat)

alınan örnekler 30 dakika kaynatılarak reaksiyon durdurulmuştur. Hidrolitik ürünler silica jel 60 ince tabakaları (20X20 cm, Merck, Germany) üzerine spotlanmış ve kloroform/asetik asit/su (60:70:10, v/v/v) içeren solvent sistemi içerisinde yürütülmüştür. Oluşan spotlar ince tabaka üzerine H₂SO₄/ethanol (5:95, v/v) püskürtülerek ve daha sonra 120°C 10 dakika inkübe edilerek görünür hale getirilmiştir.

2.6.6. Amilaz enziminin LC/MS/MS ile belirlenmesi

LC-MS/MS, SDS-PAGE ve zimogram sonrası belirlenen protein bandlarının tanımlanması için kullanılmıştır. SDS-PAGE sonrası boyanan jellerden istenilen bandlar bisturi yardımı ile kesilerek küçük parçalara bölünmüş ve düşük protein bağlama özellikli eppendorf tüplere aktarılmıştır. Kesilen jel parçasından, peptit fragmantların eldesi aşağıda belirtilen in-gel digestion protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir [127].

In-Gel Digestion Örnek Hazırlama Protokolü:

1. Fikse edilmiş jelden neşter ile tanımlaması gerçekleştirilecek olan protein örnekleri kesilve cam yüzey üzerinde kesilen jel parçası küçük parçalara bölünmüştür.
2. Parçalanmış jel eppendorf tüpe transfer ederek 200-500 ul asetonitril : 100 mM amonyum bikarbonat (1:1 karışım) çözeltisi ile karıştırıcı kullanılarak 15-30 dk muamele edilerek boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Temizleme işlemi komasi boya tamamen temizlenene kadar tekrarlanmıştır.
3. Temizleme çözeltisi pipet ile uzaklaştırılmış ve jel parçaları asetonitril ile muamele edilmiş, asetonitrilin fazlası pipet ile uzaklaştırılarak jel 50°C ısıda kurutulmuştur.
4. Eppendorfa 100 µl, 10 mM DTT ilave edilerek 80°C'de 30 dk bekletilmiş, ardından eppendorfa 100 µl, 55 mM iyodoasetamit ilave edilerek oda sıcaklığında 20 dk karanlıkta inkübe edilmiştir
5. Eppendorfa katılan DTT ve IAA pipet ile uzaklaştırılmış ve jel parçaları iki defa 500 µl, 500 mM amonyum bikarbonat ile yıkanmıştır. Yıkama çözeltileri pipet ile uzaklaştırılmıştır.

6. Jel parçaları, 200 µl asetonitril ile muamele edilmiş ve asetonitril uzaklaştırılarak jel parçaları 200 µl, 50 mM amonyum bikarbonat ile gevşetilmiş ve amonyum bikarbonat uzaklaştırmıştır. Bu işlem bir kaç kez tekrarlanmıştır.
7. Sonrasında jel parçaları 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde hazırlanmış 20 ng/ul tripsin içerisinde inkübe edilmiştir.
8. Tripsinizasyon için örnekler, 16-18 saat 37°C ısıda inkübe edilmiş ve işlem sonrası 10-15 saniye eppendorf spin edilmiştir.
9. %1 formik asit ve %2 asetonitrilden oluşan ekstraksiyon çözeltisi jel parçalarının üstüne ilave edilmiş ve örnekler 30 dk çalkalamaya bırakılmıştır.
10. Eppendorf içindeki peptit solüsyonu LC viyaline transfer edilerek LC/MS/MS ile analiz edilmiştir.

Eğer peptit solüsyonunu LC/MS/MS için daha temiz hale getirilmek istenilirse C₁₈ Zip-Tip kolonlarından geçirmek gerekmektedir. Daha sonra elde edilen peptid fragmentleri LC-MS^E teknolojisi ile ayrılmaktadırlar. Bu metoda peptid fragmentleri iki boyutlu katyon değişim (SCX) ve ters-faz kromatografisi (RP) ile birbirlerinden ayrılırlar. Peptit kütleleri MS analizi ile manyetik veya elektrik alanda hareket ederken kütle/yük (m/Z) oranlarının belirlenmesi prensibine göre ayırt edilirler. Daha sonra amino asit sekansları da MS/MS analizi sonucunda belirlenir. Daha sonra karışımdaki bireysel peptidlerin ölçülen kütleleri, proteinlerin tanımlanması için veritabanlarında bulunan bir proteinde bulunduğu düşünülen teorik olarak türetilmiş peptit kütleleri ile kıyaslanır. Bunun için en çok kullanılan yazılımlar MASCOT ve Protein Lynx Global Server (PLGS) programlarıdır.

SDP1 amilazıda yukarıdaki açıklamalar doğrultusunda analiz edilmiştir.

2.6.7. Dairesel dikroizm spektroskopisi (CD)

Dairesel Dikroizm Spektroskopisi, moleküllerin CD'sini bir dalga boyu aralığında ölçebilen spektroskopik bir tekniktir. CD spektroskopisi her çeşit ve büyüklükteki kiral moleküllerini incelemek için yaygın olarak kullanılır. Birincil kullanım amacı, ikincil yapı veya makromoleküllerin uygunluk analizidir. Özellikle proteinlerin ikincil yapısı çevreye, sıcaklığa ve pH değerine karşı duyarlıdır, dairesele dikroizm sayesinde ikincil yapıların çevreden nasıl etkilendiği veya diğer moleküllerle etkileşimi gözlemlenebilir.

Dairesel Dikroizm (CD) deneyleri, bir Peltier tipi sıcaklık küvet tutucusu ile donatılmış Jasco J-815 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uzak-UV spektrumları 0.1 cm yol uzunluğu kuvars küvet kullanılarak kaydedilmiştir. Proteinler, 20 mM glisin-HCl, pH 4.0, 20 mM fosfat tamponu, pH 7.0 ve 20 mM glisin-NaOH pH 9.0 içinde analiz edilmiştir. Tarama dalga boyu 190-250 nm, tarama hızı 100 nm/min kullanılmış ve ardışık 3 tarama sonucunun mean değeri sonuç datası olarak kabul edilmiştir.

2.7. SDP1 Amilazının Saflaştırılması

İzolat SDP1'dan elde edilen α -amilaz enziminin saflaştırılması sırasında (ultrafiltrasyon, amonyum sulfat çöktürmesi, iyon-değişim kromatografisi, manyetik aljinat küreleri gibi) farklı yöntemler denenmiştir.

İzolat SDP1 tarafından üretilen α -amilaz enzimi hücre dışına salgılanan bir enzim olduğundan, fermentasyon sonunda hücreler santrifüjlenerek (SIGMA 6K15 model santrifüj; 9000g, 45 dak, 0-4 °C) ortamdan uzaklaştırılmış ve kültür üst sıvısı enzim saflaştırması için kullanılmıştır.

2.7.1. Ultrafiltrasyon ile örneklerin konsantre edilmesi

Ultrafiltrasyon belirli bir gözenek çapına sahip yarı geçirgen membranlar kullanılarak istenilen çözeltiyi farklı moleküller büyüklüklerine göre ayırmak ve çözeltiyi konsantre etmek için kullanılmıştır. Ultrafiltrasyon işlemi, sisteme azot ile basınç uygulanarak yapılmaktadır. Ultrafiltrasyon membranlarının gözenek büyüklüklerinin ifadesinde gözenek çapı yerine "Nominal Molekül Ağırlık Geçirme (Nominal Molecular Weight Cut-off=NMWC)" teriminin kullanılması daha yaygındır. NMWC terimi membrandan geçemeyecek en küçük molekül ağırlıklı globüler molekül için kullanılır. Ancak membran seçilirken molekül ağırlığının yanında molekülün yapısının da göz önüne alınması gerekmektedir.

Saflaştırmanın ilk basamağı olarak fermentasyon sıvısı 10.000 cut-off ve 30.000 cut-off değerindeki nitroselüloz membranlarından geçirilerek konsantre edilmiş. Alt ve üst sıvı ayrı ayrı protein miktarı ve aktivite ölçümleri yapılmıştır.

2.7.2. İyon-değişim kromatografisi

İyon değiştirme, proteinleri elektrik yüklerine bağlı olarak ayırmayı ve sadece elektrik yüklü gruplarındaki marjinal değişikliklerle tekrar çözümlerini hedefler. Proteinlerin ayrılması onların tamponlu mobil faz ve inorganik elektrik yüklü grupların iliştirildiği bir matriksden ibaret olan durgun faz arasındaki denge dağılımlarında olan farklılıktan yararlanılarak başariılır. İyon değiştirmenin protein saflaştırmada kullanılabilmesi için durgun faz pozitif veya negatif yüklü proteinleri bağlayabilme kapasitesine sahip olmalıdır. Bu amaçla iyon değiştirici matriksler anyonik proteinlerin adsorpsiyonu için pozitif yüklü gruplarıyla (sırasıyla anyon değiştiriciler ve katyon değiştiriciler) modifiye edilirler.

Bu çalışma da matriks olarak DEAE selüloz kullanılmıştır. Protokole uygun olarak rejenere edilen DEAE-selüloz materyali kolona(25 cm x 2.5 cm çap) dökülmüş ve ilk olarak 20mM fosfat tamponu (pH 7.0) ile dengelenmesi sağlanmıştır. Daha sonra örnek kolona yüklenerek aynı tamponla 15 ml saat⁻¹ akış hızında elüe edilmiştir. Kolon elüsyon çözeltilisi otomatik fraksiyon toplayıcıdaki tüpler içinde toplanmış ve her bir tüpte 280 nm' de optik yoğunluk ölçümü ile protein varlığı bakılmış ve enzim aktivitesi 2.3.2.1 de belirtilen yöntem ile belirlenmiştir. Amilaz enzimi, kolona bağlandığı için daha sonra artan tuz gradienti uygulanarak (0.5M-2.5M) enzim elüe edilmeye çalışılmıştır. Toplanan fraksiyonlarda 280 nm'de optik yoğunluk ölçümü ile protein varlığına bakılmış ve enzim aktiviteleri 2.3.2.1 de belirtilen yöntem ile belirlenmiştir. Aktivite gösteren fraksiyonlardaki proteinlerin varlığı SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir.

2.7.3. Amilaz enzim saflaştırmasında manyetit-aljinat kürelerinin kullanılması

2.7.3.1. Demir manyetitlerin hazırlanması

12.8 g FeCl₂.4H₂O ve 34.56 g FeCl₃.6H₂O 1.6 litre dH₂O ya eklendikten sonra solüsyon 70°C'ye ısıtılmıştır. Başka bir beherde, 32 gram NaOH, 320 ml dH₂O içinde çözüldükten sonra ısıtılmış solüsyonuna eklenmiş ve anında siyah bir çökelti oluşumu gözlenen solüsyon oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra üst sıvının bir kısmı aspire edilmiştir. Kalan magnetite solüsyonu defalarca distile su ile yıkanmış ve 400 ml distile su içinde çökmüş bulunan Fe₃O₄ süspansiyonu 25°C de 16 saat ultrasonic banyoda bekletilmiştir [128].

Gerçekleşen Kimyasal reaksiyon aşağıda verilmiştir.



2.7.3.2. Manyetik kalsiyum aljinat mikro kürelerinin hazırlanması

50 ml sodyum aljinate - Fe_3O_4 hazırlamak için : %2 sodyum aljinate 30 ml distile su da çözülmüş, daha sonra üzerine 20 ml Fe_3O_4 süspansiyonu eklenerek karıştırılmıştır. Hazırlanan bu karışım, bir şırıngaya konulup damla damla 100 ml 0.1 M CaCl_2 solüsyonuna damlatılmıştır. Oluşan kalsiyum aljinate mikro küreleri 1 saat boyunca 0.1 M CaCl_2 solüsyonunda bekletilmiş ve 6mM CaCl_2 solüsyonuna alınarak 4°C da saklanmıştır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Manyetik Aljinate Mikroküreleri

2.7.3.3. Amilazın manyetik aljinate mikrokürelerine bağlanması

Aljinate mikroküreleri öncelikle bağlanması düşünülen enzimin içinde bulunduğu tampon (fosfat tamponu pH 7.0) içine alınarak ön dengeleme yapılmıştır. Daha sonra 3 ml aljinate küresi üzerine 1 ml amilaz enzimi eklenerek oda sıcaklığında en az 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. Üst sıvı mikrokürelere uzaklaştırılarak mikroküreler 1ml 20mM fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Aljinate mikrokürelerine bağlanan amilaz enziminin elüsyonu için mikroküreler 1.0 M maltoz solüsyonu ile 4°C de 4 saat inkübe edilmiş örneklerin aktivitesi 2.3.2.1 de verilen yöntem ile belirlenmiştir. SDS-PAGE ile bağlanan proteinlerin profilleri de belirlenmiştir.

2.8. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı sığır serum albumininin (BSA) standart olarak kullanıldığı, Coomassie Blue Boyası Bağlama Yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [129].

Protein standart grafiğinin oluşturulması için; 10 mg BSA 10 ml distile suda çözülmüştür. 1 mg/ml BSA çözeltisine 9 ml distile su eklenerek seyreltme yapılmış ve konsantrasyonu duyarlılık içinde kalan standartlar (5, 10, 15, 20, 25, 30 µg BSA/ ml olacak şekilde) uygun sulandırma yapılarak hazırlanmıştır. 1 ml örnek üzerine 1 ml Coomassie Blue reaktifi eklendikten sonra karışımın absorbans değeri spektrofotometrede (BioRad Smart Spec 3000) 595 nm' de ölçülmüştür. Elde edilen verilerden aşağıdaki formül yardımıyla protein miktarı hesaplanmıştır. Protein standart grafiği Ek 7' de verilmiştir.

$$\text{Protein } (\mu\text{g/ml}) = \frac{(\text{A}_{595}/\text{Eğim}) \times \text{Seyreltme faktörü}}{1000}$$

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Çukurova Bölgesinden İzole Edilen SDP1 İzolatının Ürettiği Enzimlerin Belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan amilaz üreticisi mikroorganizma Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümünden Prof. Dr. Sadık Dinçer tarafından *Acacia cyanophilla* (Kıbrıs akasyası) kök rizosferinden izole edilmiştir.

3.1.1. Katı besiyerinde SDP1 izolatının enzim üretiminin belirlenmesi

3.1.1.1. Amilaz üretiminin belirlenmesi

Amilaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, izolat SDP1 (g/l) 20 gr nişasta 15 gr agar içeren (pH 7.0) amilaz seçici ortamına ekilerek 37 °C'de 48 ve 72 saat boyunca inkube edilmiştir (Gerhardt ve ark. 1981). İnkübasyon sonucunda petri kaplarının üzeri 0.5 % (w/v) I₂ and 5.0 % (w/v) KI içeren Lugol çözeltisi ile kaplanmıştır. Petri kaplarının üzerinde görünen berrak zon alanı izolat SDP1'in amilaz aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. (Şekil 3.1.).

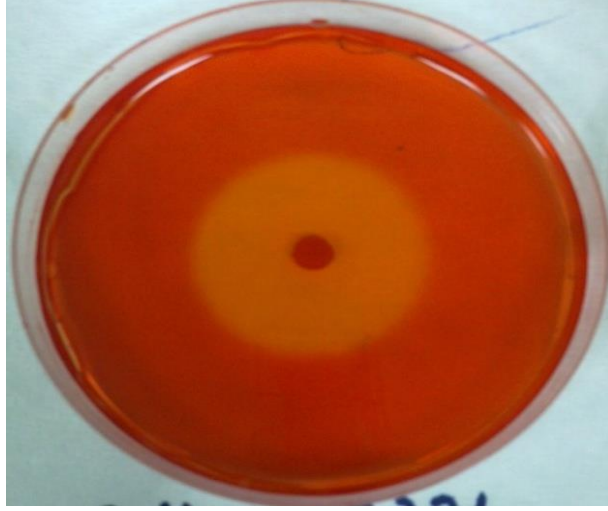


Şekil 3.1. İzolat SDP1'nin katı besiyerinde 72.saat amilaz aktivitesi

3.1.1.2. Selüloz üretiminin belirlenmesi

Selüloz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla izolat SDP1 besiyeri 11'de belirtilen selüloz seçici ortamına ekilerek 37 °C'de 48 ve 72 saat boyunca inkube edilmiştir.

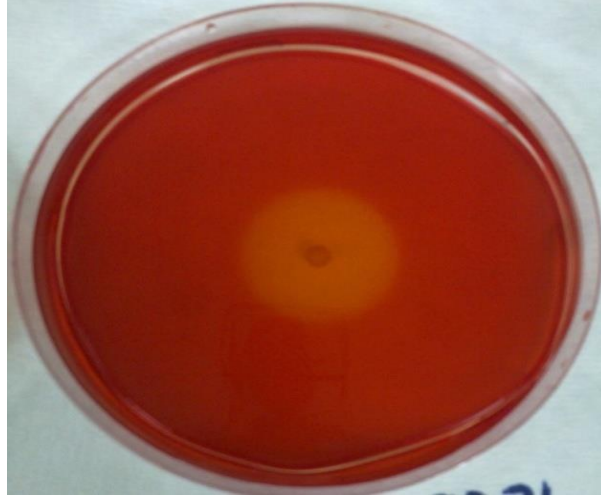
İnkübasyon sonucunda petri kaplarının üzeri önce %1' lik Kongo Kırmızısı ile kaplanmış daha sonra boyanın fazlası 1 M NaCl ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Petride görülen berrak zon alanı izolat SDP1'in selülaz aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. İzolat SDP1'nin katı besiyerinde 60.saat selülaz aktivitesi

3.1.1.3. Ksilanaz üretiminin belirlenmesi

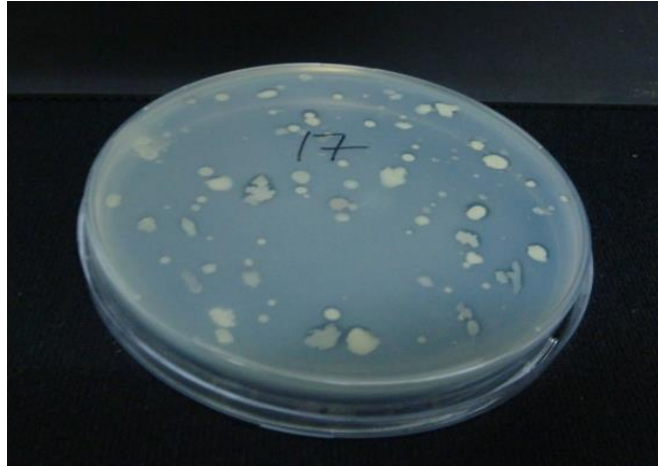
Ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla izolat SDP1, besiyeri 13'de belirtilen ksilanaz seçiçi ortamına ekilerek, 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda petri kaplarının üzeri selüloz tayininde olduğu gibi önce %1' lik Kongo Kırmızısı ile kaplanmış daha sonra boyanın fazlası 1 M NaCl ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Petride görülen berrak zon alanı izolat SDP1'in ksilanaz aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. İzolat SDP1'nın katı besiyerinde 60.saat ksilanaz aktivitesi

3.1.1.4. Katı besiyerinde fitaz üretiminin belirlenmesi

Besiyeri 14'de belirtilen ortama ekilen SDP1, 37 °C de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. 2. günden sonra kolonilerin etrafında sodyum-fitat kullanımından kaynaklanan şeffaf zone oluşumları görülmeye başlanmıştır (Şekil 3.4.).



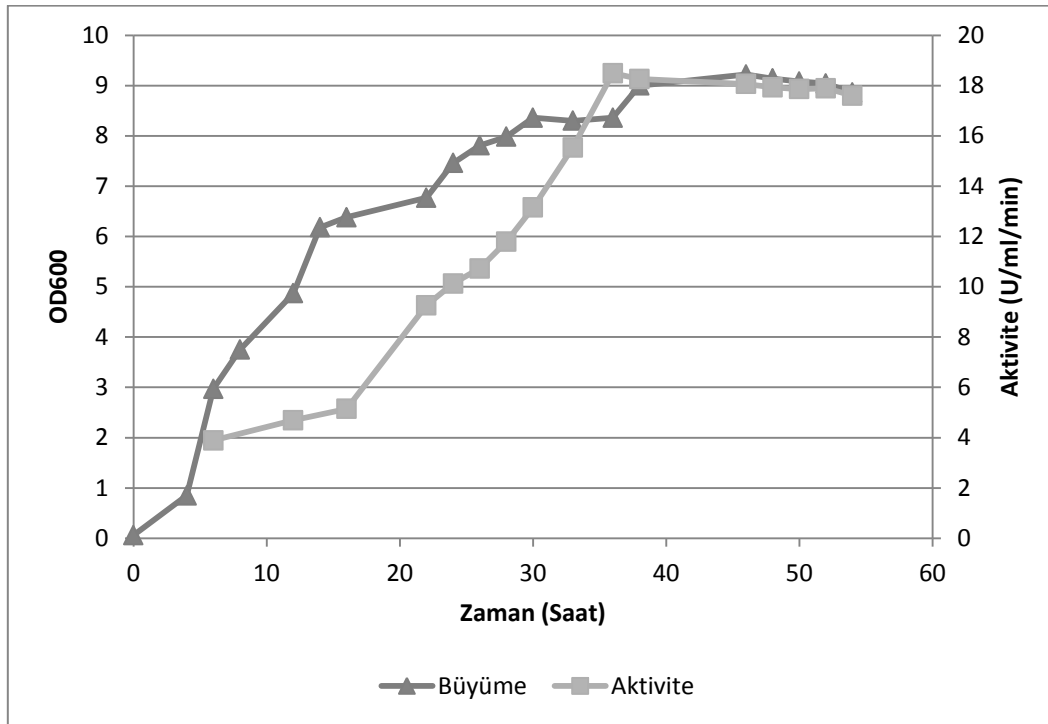
Şekil 3.4. İzolat SDP1'nın katı besiyerinde fitaz aktivitesi

3.1.2. Sıvı besiyerinde enzim profillerinin belirlenmesi

SDP1 izolatu, tüm enzimleri belirli oranda katı besiyerinde üretmektedir. Fakat en iyi zon çapı, amilaz üretiminde belirlendiği için tezi çalışmasına amilaz enzimi ile devam edilmiştir. Öncelikle SDP1 izolatının tanılama çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.1. Sıvı ortamda amilaz üretiminin incelenmesi

İzolat SDP1, α -amilaz sentezine eksponansiyel fazın erken aşamalarında başlayıp maksimum seviyesine durağan fazın başlarında 36.saatte ulaşmaktadır (Şekil 3.5.). Benzer sonuçlar *Bacillus subtilis* AX20'den [130], *Bacillus* sp I-3'den [16], ve *Bacillus subtilis*'den [131] elde edilen amilaz için elde edilmiştir. Bu organizmalarda da amilaz sentezi eksponansiyel büyüme fazında başlayıp en yüksek değerine durağan faz sırasında ulaşmaktadır.



Şekil 3.5. İzolat SDP1'in zamana karşı büyüme ve amilaz üretim grafiği

SDP1 izolatının sıvı besiyerinde amilaz üretiminin belirlenmesini takiben, öncelikle mikroorganizmanın karakterizasyonu ve tanılanması gerçekleştirilmiştir.

3.2. Mikroorganizmanın Taksonomik Karakterizasyonu

İzolat SDP1'nin mikrobiyal karakterizasyonu Bölüm 2.4'de verilen metodlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. SDP1'in kültürel özellikleri

İzolat SDP1'nin koloni renginin krem, koloni formunun konveks, elevasyonun düz ve kenar şeklinin filamentöz olduğu belirlenmiştir.

İzolat SDP1'nin hareketliliği besiyeri 7' de verilen ortam kullanılarak incelenmiş ve hareketli olduğu belirlenmiştir.

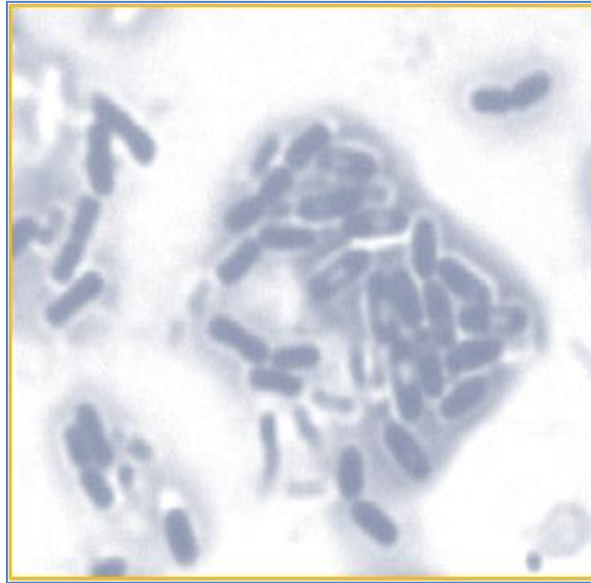
3.2.2. SDP1'in mikroskopik özellikleri

İzolat SDP1'nin gram boyama ve endospor boyama metodları ile hazırlanan preparatlarının ışık mikroskopunda fotoğrafları çekilmiştir. İzolat SDP1'nin ışık mikroskopunda yapılan ölçüm sonuçları Tablo 3.1. de verilmiştir.

Tablo 3.1. İzolat SDP1'nin ışık mikroskopunda yapılan ölçüm sonuçları

| İzolat no | Bakterinin boyu (µm) | Bakterinin eni (µm) | Sporun boyu (µm) | Sporun eni (µm) | Sporun konumu | Sporun şekli |
|-----------|----------------------|---------------------|------------------|-----------------|---------------|--------------|
| SDP1 | 2.223 | 0.703 | 1.203 | 0.585 | Central | Elipsoidal |

Işık mikroskopunda yapılan inceleme sonucunda izolat SDP1'nin gram pozitif ve morfolojik olarak çubuk şekilli olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. İzolat SDP1'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü

3.2.3. SDP1'in Fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

Kültürel ve fizyolojik özelliklerine göre *Bacillus* ailesine ait olduğu belirlenen izolat SDP1'nin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan ortamlarda ki fotoğrafları EK 3'de verilmiştir. İzolat SDP1'nin fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri referans soy

Bacillus subtilis DSM 10^T ile karşılaştırılarak Tablo 3.2.'de sunulmuştur. Karbohidrat kullanım profillerinin belirlenmesi için kullanılan API 50CHB testinin sonuçları ise Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. İzolat SDP1 ve referans soy *Bacillus subtilis* 10^T'nin fenotipik özellikleri

| Özellikler | İzolat SDP1 | * <i>B. subtilis</i> DSM 10 ^T |
|--------------------------------|-----------------------|--|
| Hareketlilik | + | + |
| Spor | | |
| Şekil/Pozisyon | Ellipsoidal/Central | Elipsoidal/Central |
| Gram Boyama | + | + |
| Katalaz | + | + |
| Oksidaz | - | + |
| Nitrat redüksyonu | + | + |
| İndol Oluşumu | - | - |
| Hidrolizleme: | | |
| Kazein | + | + |
| Jelatin | + | + |
| Nişasta | + | + |
| Üre | - | - |
| Büyüme | | |
| 10 °C | ND | ND |
| 50 °C | + | - |
| 10 % NaCl | + | + |
| 12 % NaCl | + | - |
| 15 % NaCl | - | - |
| pH 5.0 | + | + |
| pH 7.0 | + | + |
| pH 9.0 | + | + |
| pH 10.0 | zayıf | - |
| Ayırıcı ana major Yağ asitleri | Iso-C _{15:0} | Iso-C _{15:0} |

* *Bacillus subtilis* DSM 10^T ait veriler [132]

Tablo 3.3. İzolat SDP1 ve referans soy *Bacillus subtilis* 10^T'nin karbohidrat kullanım profilleri

| Özellikler | SDP1 | * <i>B. subtilis</i> DSM 10 ^T |
|----------------------|------|--|
| Glycerol | + | + |
| Erythritol | - | - |
| D-Arabinose | - | - |
| L-Arabinose | + | + |
| Ribose | + | + |
| D-Xylose | + | + |
| L-Xylose | - | - |
| Adonitol | - | - |
| β-Methyl-D-Xyloside | - | - |
| Galactose | - | - |
| D-Glucose | + | + |
| D-Fructose | + | + |
| D-Mannose | + | + |
| L-Sorbose | - | - |
| Rhamnose | - | - |
| Dulcitol | - | - |
| Inositol | + | + |
| Mannitol | + | + |
| Sorbitol | + | + |
| α-Methyl-D-Mannoside | - | - |
| α-Methyl-D-Glucoside | + | + |
| N-Acetyl Glucosamine | - | - |
| Amygdalin | + | + |
| Arbutin | + | + |
| Esculin | + | + |
| Salicin | + | + |
| Cellobiose | + | + |
| Maltose | + | + |
| Lactose | - | - |
| Melibiose | + | + |
| Saccharose | + | + |
| Trehalose | + | + |
| Inulin | + | + |
| Melezitose | - | - |
| D-Raffinose | + | + |
| Starch | + | + |
| Glycogen | + | + |
| Xylitol | - | + |
| Gentiobiose | - | - |
| D-Turanose | - | + |
| D-Lyxose | - | - |
| D-Tagatose | - | - |
| D-Fucose | + | - |
| L-Fucose | - | - |
| D-Arabitol | - | - |
| L-Arabitol | - | - |
| Gluconate | + | - |
| 2-Keto-Gluconate | - | - |
| 5-Keto-Gluconate | - | - |

(*) *Bacillus subtilis* DSM 10^T ait veriler [133] 'den alınmıştır.

Tablo 3.4. İzolat SDP1 ve referans soy *Bacillus subtilis* 10^T'nin yağ asiti profilleri

| Yağ Asidi | % Toplam Yağ Asitleri | |
|-----------------------|-----------------------|--|
| | SDP1 | * <i>Bacillus subtilis</i> DSM 10 ^T |
| Doymuş düz zincir | | |
| C14:0 | - | - |
| C16:0 | 3.10 | 3.82 |
| Doymuş dallanmış | | |
| iso-C14:0 | 1.30 | 0.86 |
| iso-C15:0 | 17.10 | 23.42 |
| iso-C16:0 | 4.90 | 2.59 |
| iso-C 17:0 | 12.90 | 11.38 |
| anteiso-C 15:0 | 37.90 | 38.79 |
| anteiso-C 17:0 | 16.00 | 12.92 |
| Mono-saturated | | |
| 16:1 ω1 Ic | 1.30 | 1.79 |
| iso 17:1 ω10c | 2.00 | 2.23 |
| **Toplanan özellikler | 1.00 | 1.21 |

* *Bacillus subtilis* DSM 10^T datası[134] nolu referanstan alınmıştır.

** Toplanan özellikler gas kromatografisine bağlı MIDI sistemi ile ayıramayan iki veya üç yağ asidinden oluşna grupları tanımlamak için kullanılır. Toplanan özellikler iso-17:1ω7c asit and anteiso-17:1ω7c asitleri içermektedir.

3.2.5. SDP1 izolatının genotipik özellikleri

3.2.5.1. Genomik DNA izolasyonu

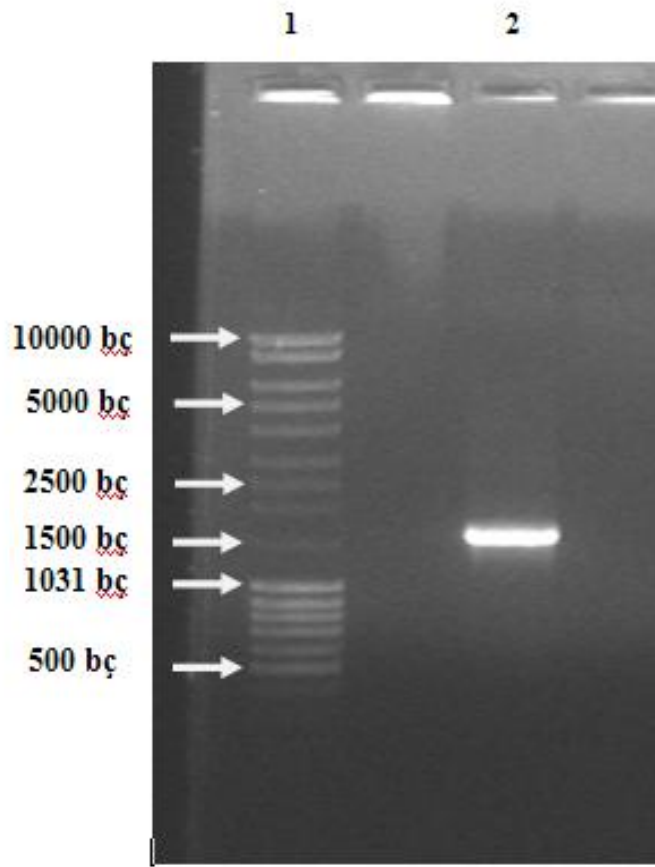
İzolat SDP1'nin genomik DNA'sı "Invitrogen Pure Link Genomic DNA kiti"nde belirtilen prosedüre göre izole edilmiştir. İzolasyon sonrası önce genomik DNA'nın saflığı ve miktarı nanodrop ile spektroskopik olarak OD 260/280 değerlerine bakılarak kontrol edilmiştir. Daha sonra genomik DNA, %1lik agaroz gel'de koşturularak kontrol edilmiş ve fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. İzolat SDP1'a ait genomik DNA görüntüsü

3.2.5.2. 16s rDNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması

İzole edilen SDP1 genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak, universal primerler 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve 1525R 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' yardımı ile yapılan PZR ile izolat SDP1'a ait 16SrDNA geni çoğaltılmıştır. PZR sonucunda ürün %1'lik agaroz jelde koşularak fotoğraf çekilmiştir (Şekil 3.9.). Agaroz gel sırasında marker olarak MassRuler™ DNA Ladder, Mix-ready-to-use (Fermentas) kullanılmıştır.



Şekil 3.9. İzolat SDP1'nin 16sRNA geni 1) MassRuler™ DNA Ladder, Mix-ready-to-use (Fermentas) 2) PZR ürünü

3.2.5.3. 16S rRNA gen dizisinin belirlenmesi

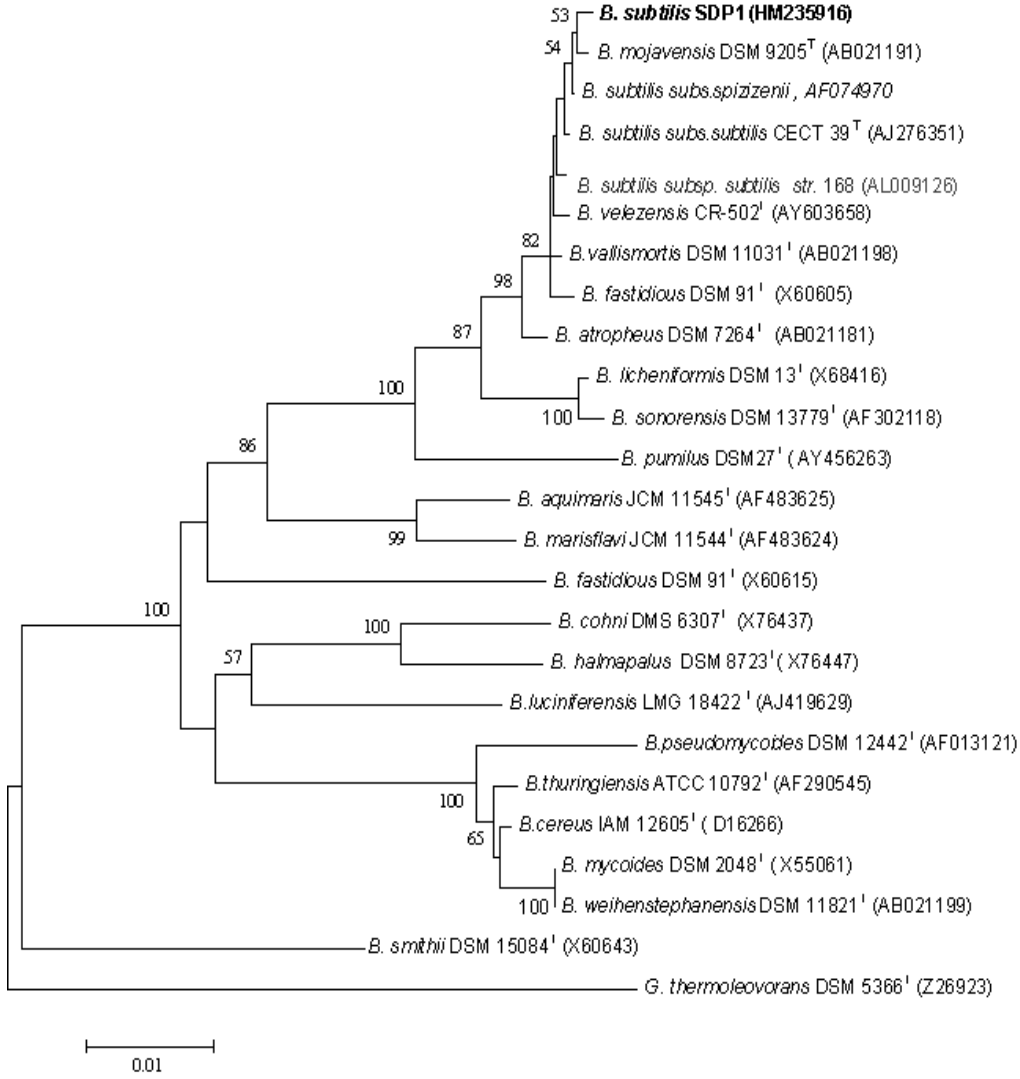
SDP1 izolatına ait 16S rRNA dizisinin belirlenmesi amacı ile 7 farklı (27F, 357F, 515R, 530F, 803F, 1100R, 1525R) primer kullanılmıştır. Primer bilgileri 2.4.5.5. de verilmiştir.. Sekans cihazından alınan ham data BioEdit programı ve Clustal Multiple Alignment Program (Clustal W 1.8)[120] kullanılarak düzenlenmiş, birleştirilerek sonuç (consensus) dizisine ulaşılmıştır. 1510 bp'lik PZR ürünü aşağıda verilmiştir. Benzerlik araştırması (GenBank/EMBL/DDBJ) veritabanlarında bulunan Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) programı [121] kullanılarak ve referans veritabanları kullanılarak yapılmıştır [122]. İzolat SDP1'nin *Bacillus subtilis* ile %99 benzerlik gösterdiği ve aynı küme içinde bulunduğu belirlenmiştir. Blast sonucu EK 6'da verilmiştir.

>SDP1

```
AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAA
GTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAG
TAACACGTGGGTAACYTGCCGTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGC
TAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCG
GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGG
CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGA
TCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTAC
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATKGGGCGTAAAGGGCTCGCA
GGCGGTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAT
TGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGC
GGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGG
TCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTGAGGGGGTTTTCCGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCA
AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAA
TCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTT
AAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT
GCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCG
AAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGAT
TGGGGTGATAGTCGTAACCAGGTAGC
```

3.2.5.4. Filogenetik ağacın oluşturulması

İzolat SDP1'in filogenetik pozisyonunu belirlemek amacı ile referans *Bacillus* türlerinin 16S rDNA dizileri ile karşılaştırmalı olarak Şekil 3.10.'da verilen filogenetik ağaç, Saitou ve Nei' nin, (1987) [135] “neighbour-joining method”u kullanılarak MegaTree programı kullanılarak oluşturulmuştur. İzolat SDP1'in *Bacillus subtilis* soyları ile benzerliği incelenmiştir. *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366^T grup dışı organizma olarak kullanılmıştır. Karşılaştırmalı 16S rRNA gen sekans analiz sonucunda izolat SDP1'in *Bacillus subtilis* grubu üyelerine 99 % benzerlikte olduğu görülmüştür.



Şekil 3.10. İzolat SDP1'in neighbour-joining metodu kullanılarak çizilen filogenetik ağacı. Bootsap değerleri 1000 tekrarın ortalaması alınarak elde edilmiş ve sadece %50'i geçen değerler gösterilmiştir.

3.2.5.5. %G+C mol değerinin belirlenmesi

%G+C mol değerlerinin belirlenmesi izolatların cins düzeyinde belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Bakteriyal kromozom DNA'nın %G+C miktarları türden türe %25 ile %80 mol arasında değişiklik göstermektedir [136] Termal denatürasyon sıcaklığı (*T_m*) bakteriyel DNA'nın G+C miktarının belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemdir[137]. %G+C mol değerlerinin hesaplanmasında referans organizmalar kullanılarak sapma değerleri hesaplanmıştır. Normal şartlar altında K12 suşunun *T_m* değeri 75,09 °C ve %G+C değeri 51,7 olarak belirlenmiştir. Bu şartlara altında standart sapma 78,20 – 75,09 = 3,11°C dir.

İzolat SDP1'in %G+C mol değerleri = $2,44 * (T_m - 53,9)$ formülü kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar tip tür K12 ile karşılaştırmalı olarak Tablo. 3.5.'de verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi, elde edilen sonuçlar sunulan literatür ile uyumludur. Örneğin *Bacillus subtilis subsp. subtilis* str. 168'in % G+C mol değeri % 43.52 olarak belirlenmiştir [58].

Tablo 3.5. İzolat SDP1'in %GC Mol değerleri

| Örnek | Özgün değeri °C | T _m Standart değeri °C | T _m %GC değeri |
|---------------|-----------------|-----------------------------------|---------------------------|
| K12 (Tip Tür) | 78,2 | 75,09 | 51,7 |
| SDP1 | 74,6 | 71,5 | 42,9 |

Yapılan mikroskopik, fizyolojik, biyokimyasal ve genomik test sonuçları birleştirildiğinde, izolat SDP1 *Bacillus subtilis* olarak tanımlanmış ve “*Bacillus subtilis* strain SDP1 16s ribosomal RNA gene” adı ile NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası'na **HM235916** kayıt numarası ile kaydedirilmişdir.

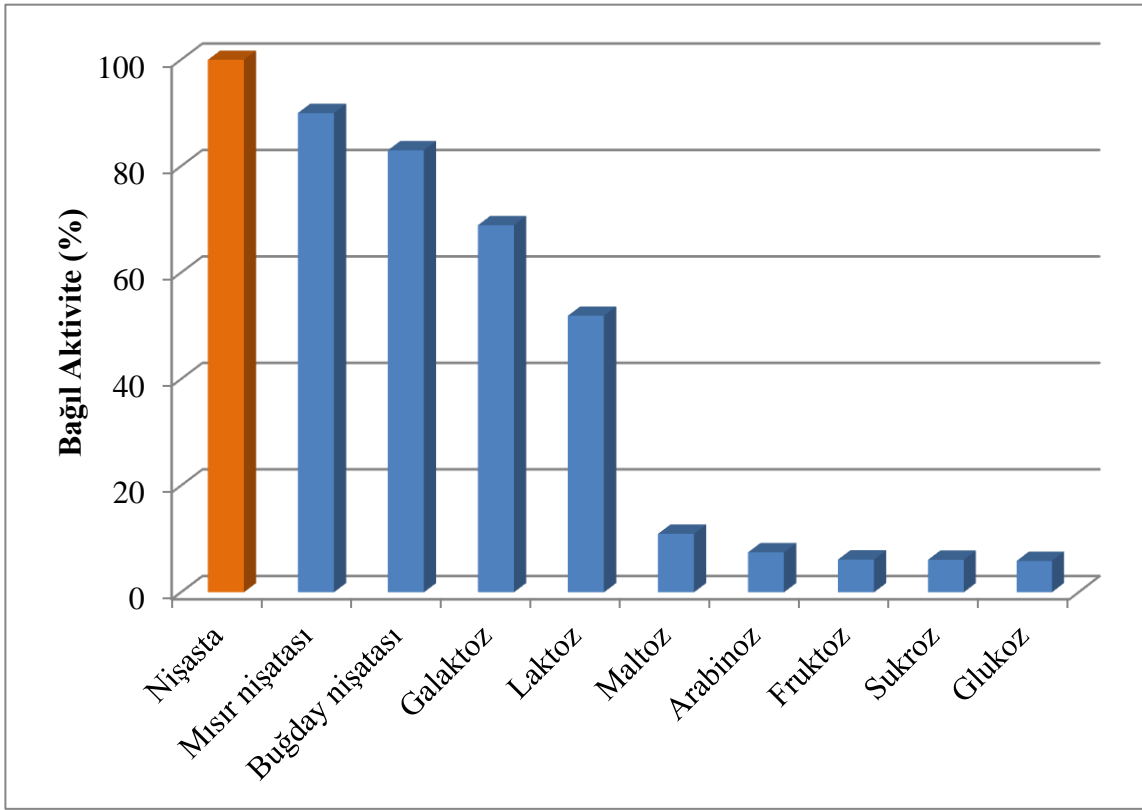
Organizma TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü ve Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümünde saklanmaktadır.

3.3. Çalkalamalı Kültürde *Bacillus subtilis* SDP'in Enzim Üretim Kkoşullarının Optimizasyonu

3.3.1. Farklı karbon kaynaklarının SDP1 amilaz üretimi üzerine etkisi

Farklı karbon kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi incelenirken, ilk olarak 11 farklı karbon kaynağı (maltoz, glikoz, galaktoz, laktöz, fruktoz, sükroz, arabinoz, nişasta, ksiloz, rafinoz ve dekstran) denenmiş ancak ksiloz, rafinoz ve dekstran varlığında hiç aktivite gözlemlenmediği için daha sonra ki denemelere 8 farklı karbon kaynağı ile devam edilmiştir. Ayrıca farklı nişasta türlerinin etkisinin incelenmesi amacı ile de mısır ve pirinç nişastası da diğer karbon kaynakları ile birlikte ortamda %1 oranında olacak şekilde, %1.0 et özütü, %0.05 CaCl₂, and % 0.05MgSO₄.7H₂O içeren üretim ortamına ilave edilmiştir. 10 farklı karbon kaynağının varlığında α-amilaz

üretimi sonuçları Şekil 3.11.'de verilmiştir. SDP1 α -amilaz üretimi karbon kaynağı olarak arabinoz, fruktoz, sükroz, maltoz veya glukoz kullanılan ortamlarda çok az olduğu belirlenmiştir. Mısır ve buğday nişastası ile aynı zamanda galaktoz sırasıyla %90, %83 ve %69 gibi nispeten yüksek bir aktivite değerlerine ulaşmıştır. SDP1 amilazı, test edilen karbon kaynakları arasında, en yüksek aktivite değerine, çözülebilen nişata ile ulaşmıştır. Genel olarak α -amilaz üretimi nişasta ve maltoz varlığında indüklenmektedir [4]. Bununla birlikte, bazı bakteri türleri için, laktoz, trihaloz ve α -metil-D-glikosid'in amilaz üretimini indüklediği rapor edilmiştir [4]. *Bacillus sp* 1-3 [16] ve *Bacillus sp* PS-7 [17] 'den amilaz üretiminde en yüksek α -amilaz üretimine karbon kaynağı olarak nişasta ile ulaşıldığı rapor edilmiştir.. Bununla birlikte, farklı mikroorganizmalarda laktoz, trihaloz ve α -metil-D-glicosit gibi karbon kaynaklarının varlığında da amilaz üretiminin indüklendiği rapor edilmiştir [4].



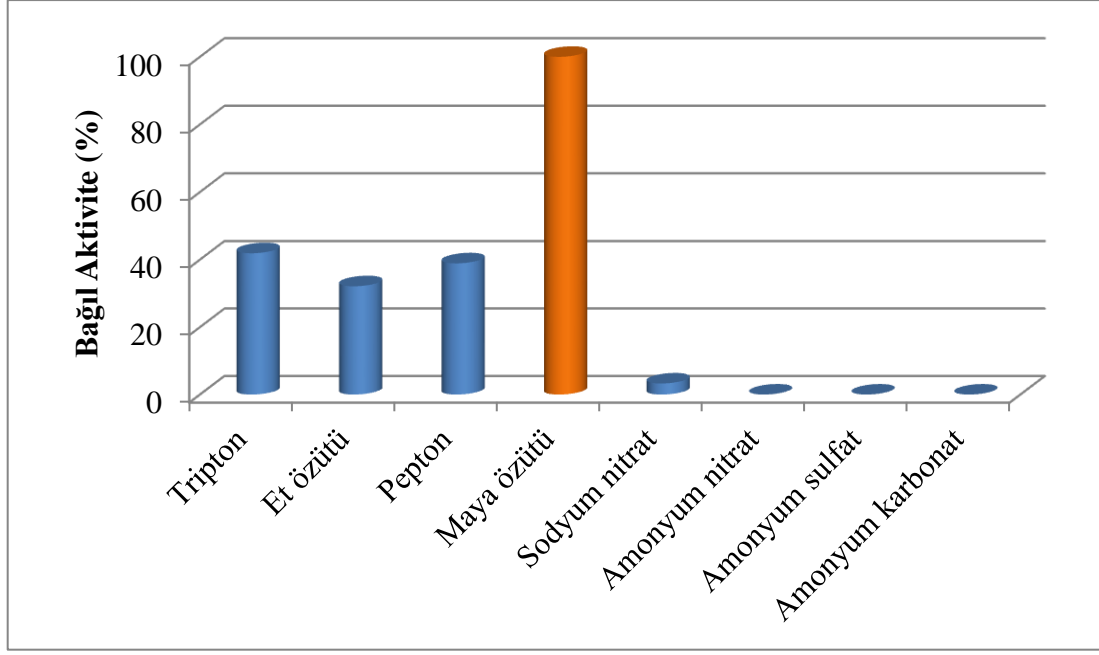
Şekil 3.11. Farklı karbon kaynaklarının SDP1 α -amilaz üretimine etkisi

3.3.2. Farklı azot kaynaklarının SDP1 amilaz üretimi üzerine etkisi

Farklı organik (pepton, et özütü, maya özütü) ve inorganik (amonyum nitrat, amonyum sulfat, amonyum karbonat, amonyum klorür ve sodyum nitrat) azot kaynaklarının ve onların farklı kombinasyonlarının, α -amilaz üretimi üzerindeki etkilerie tez çalışması kapsamında test edilmiştir. Azot kaynakları besiyeri ortamına son konsantrasyon %1 (w/v) olacak şekilde eklenmiştir. En iyi azot kaynağı olarak belirlenen maya özütünün de farklı konsantrasyonlardaki etkisi son konsantrasyon %0,5-5 aralığında olacak şekilde incelenmiştir.

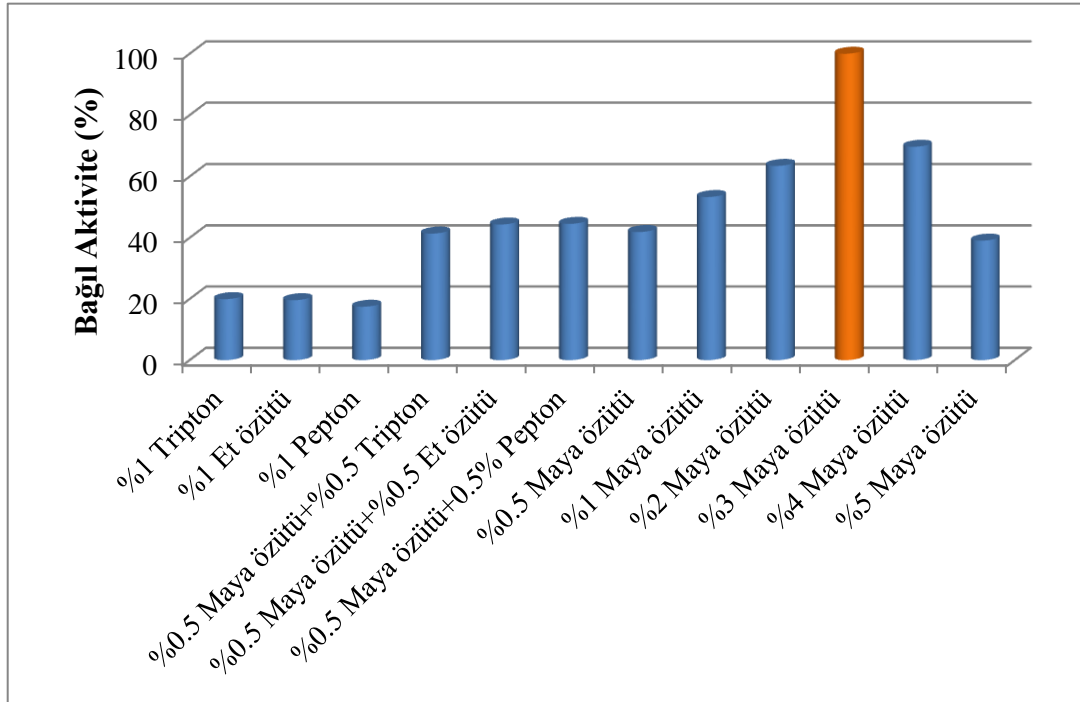
Organik azot kaynaklarının inorganik azot kaynakları ile karşılaştırıldığında yüksek amilaz üretimini destekledikleri sonuçlardan (Şekil 3.12.) görülmüştür. İnorganik azot kaynaklarından yalnızca sodyum nitrat varlığında çok az bir aktivite belirlenmiş, bunun dışındaki diğer inorganik kaynakların varlığında amilaz üretimi gözlenmemiştir (Şekil 3-12.). Benzer sonuçlar, *Bacillus licheniformis* [101], *Bacillus subtilis* [131] ve *Bacillus thermooleovorans* [138]'dan amilaz üretiminde de rapor edilmiştir.

Organik azot kaynakları incelendiğinde, maya özütünün hem büyüme de hem de enzim üretimin de diğer azot kaynaklarına göre açık bir şekilde üstün olduğu gözlenmiştir. (Şekil 3-12.). Maya özütü ile farklı organik azot kaynaklarının kombinasyonları sonucunda da %1'lik maya özütü ile yakın sonuçlar elde edilmesine karşın, en iyi sonuç yine maya özütü tek olarak kullanıldığında elde edilmiştir (Şekil 3.13.). Malhotra ve ark., (2000) [79] ve Babu and Satyanarayana (1993) [139] *Bacillus thermooleovorans* ve *Bacillus amyloliquefaciens*'da maya özütünün amilaz üretiminde diğer organik azot kaynaklarına göre belirgin üstünlüğü rapor etmişlerdir. Thippeswamy ve ark., (2006)[140] ile Mc Tigue (1994) [97] yaptıkları çalışmalarda, en iyi amilaz üretim sonuçlarına maya özütü varlığında ulaşıldığını raporlamışlardır. Maya özütünün farklı organizmalarda örneğin, *Bacillus* sp. IMD 434 [141]'de baktopepton ile, *Bacillus subtilis* [142] 'te ammonyum sülfat ile *Aspergillus oryzae* [143]'de soya unu ve et özütü ile beraber kullanıldığı literatürde belirtilmiştir. Bununla birlikte, bazı mikroorganizmalarda maya özütü yerine mısır şurubu, et özütü veya pepton kullanıldığında, daha iyi sonuç alındığını da rapor edilmiştir [4].



Şekil 3.12. Farklı azot kaynaklarının SDP1 α -amilaz üretimine etkisi

Maya özütünün farklı konsantrasyonlarının enzim üretimi üzerindeki etkisi incelendiğinde ise %0.5-%5 aralığında en iyi sonuç %3'lük maya özütü ile elde edilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda besi yeri ortamı bu şekilde revize edilmiştir (Şekil 3.13.).

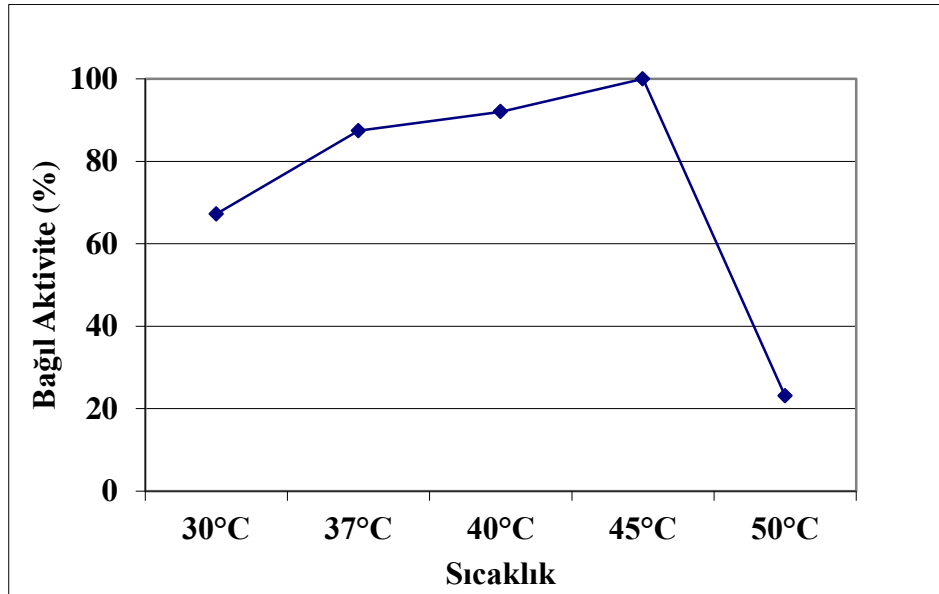


Şekil 3.13. Organik azot kaynaklarının kombinasyonları ve maya özütünün farklı konsantrasyonlarının SDP1 α -amilaz üretimi üzerine etkisi

3.3.3. Sıcaklığın SDP1 α -amilaz üretimi üzerine etkisi

İnkübasyon sıcaklığın, SDP1 α -amilaz üretimi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, 30 ile 50°C arasında değişen sıcaklıklarında enzim üretimi incelenmiştir. En yüksek aktivite değerine 45°C de ulaşılmıştır (Şekil 3.14.).

Sıcaklığın amilaz üretimi üzerindeki etkisi organizmanın büyümesi ile ilişkilidir. Bakteriler de α -amilaz üretimi için çok geniş aralıktaki sıcaklıklar rapor edilmiştir. Örneğin, *Bacillus amyloliquefaciens* Mir-41[144] amilaz üretimini 36°C 'de gerçekleştirirken, hipertermofilik *Thermococcus profundus* [28]'da amilaz üretimi 80°C'de elde edilmektedir.



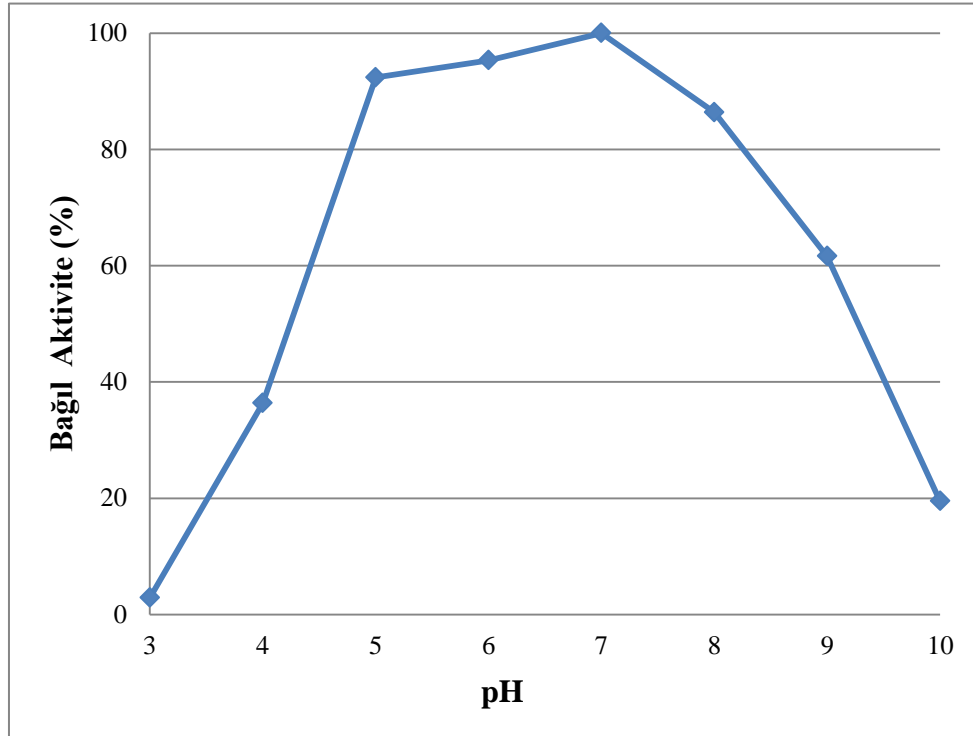
Şekil 3.14. Sıcaklığın SDP1 α -amilaz üretimine etkisi

3.4. *Bacillus.subtilis* SDP1 amilaz enziminin karakterizasyonu

3.4.1. pH'nın enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisi

pH'nın α -amilaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için amilaz reaksiyonu pH 3.0-10.0 aralığındaki farklı tampon sistemleri kullanarak belirlenmiştir. pH 3.0-4.0 için 20 mM glisin-HCl tamponu; pH 5.0-6.0 için 20 mM asetat tamponu; pH7.0-8.0 için 20 mM Tris-HCl tamponu; pH9.0-10 için 20mM glisin-NaOH tampon sistemleri kullanılmıştır. En yüksek aktivite gösteren pH değeri 100 olarak kabul edilerek diğer değerler bu değerle karşılaştırarak sonuçlar bağıl aktivite olarak verilmiştir.

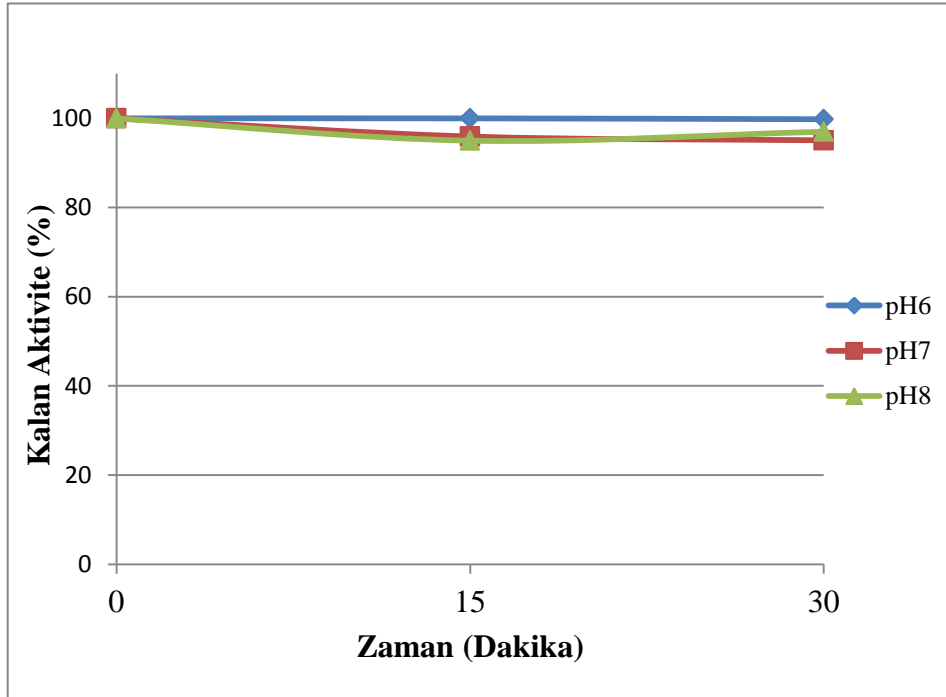
İzolat SDP1 α -amilaz'ının optimum pH değeri 7.0 olup, pH 5.0 ve pH 8.0 arasındaki geniş bir pH aralığında aktivite göstermektedir.. SDP1 α -amilaz'ın pH 5.0, pH 6.0 ve pH 8.0'deki bağıl aktivite değerleri sırasıyla %92, %95 ve %86 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.15.). *Bacillus* sp. I-3 [16] amilazının da benzer olarak optimum pH değerinin 7.0 olduğu rapor edilmiştir. SDP1 α -amilazı pH 9.0'da başlangıç aktivitesinin %60'ını koruyabilmektedir bu da enzimin alkali tolerant olduğunu düşündürmektedir. Ancak pH 10'da enzimin bağıl aktivitesi %19'lara kadar düşmektedir. pH 5.0'den düşük pH değerlerinde ise aktivite belirgin olarak azalmakta ve pH 3.0'de ise enzim aktivitesini tamamen yitirmektedir. Bunun sebebinin α -amilaz katalizi sırasında katalitik bölgede bulunan nükleofil amino asit (Asp)'nin düşük pH değerlerinde protone olması ile hidrojen donörü olan (Glu)'ın ise yüksek pH değerinde deproton olması ile sınırlı olduğu düşünülmektedir [145] . pH-aktivite profili de bu iki aktif bölge gruplarının pKa değerleri ile belirlenir. SDP1-amilazı ile benzerlik gösterdiği belirlenen *Bacillus subtilis* amilazının (PDB ID: 1UA7) pka değerleri PROPKA 3.1 yazılımı ile belirlenmiştir. Sonuç EK.9'da verilmiştir.



Şekil 3.15. pH'nın SDP1 α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi

α -amilazların optimum pH değerleri 2 ile 12 arasında değişmekle birlikte birçok bakteri ve mantarlar için optimum pH değerleri asidik ve nötral bölgede bulunmaktadır [5]. Asidik optimuma sahip amilazlara örnek olarak optimum pH'sı 3.0 olan *Alicyclobacillus acidocaldarius* [146] verilebilir. Alkaline amilazlara örnek olarak pH 9.0'da optimum amilaz üretimine sahip olan *Bacillus licheniformis* [13] gösterilebilir. Aşırı alkalofilik amilaz üreten organizmalara örnek olarak, literatürde ise optimum pH değeri 11.0 olan *Bacillus* sp. GM8901 [44] rapor edilmiştir.

İzolat SDP1 α -amilaz'ın pH 6.0–pH 8.0 arasında çok kararlı olduğu ve aktivitesinin yaklaşık %90'ını koruduğu bulunmuştur (Şekil 3.16.). *Bacillus*lara ait amilazlar incelendiğinde, benzer pH profilleri ve kararlılık sonuçları *Bacillus subtilis* KCC103 [147] and *Bacillus subtilis* AX20 [130] için de rapor edilmiştir.

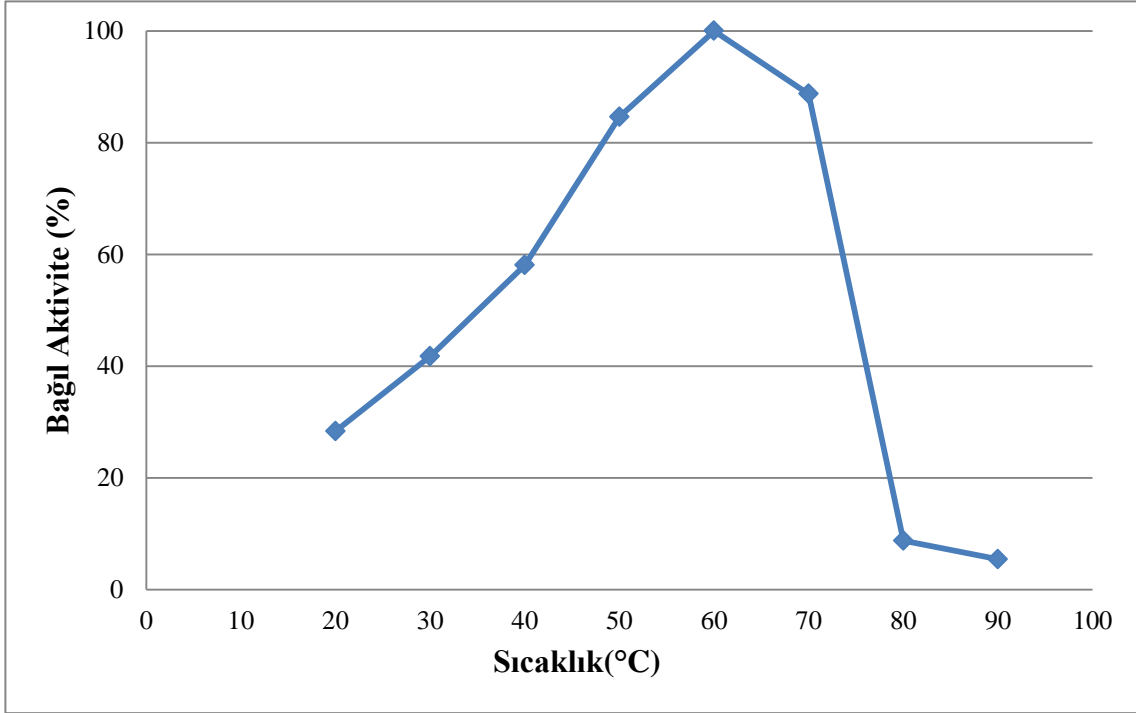


Şekil 3.16. SDP1 α -amilazının pH kararlılığı

3.4.2. Sıcaklığın enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine etkisi

Sıcaklığın SDP1 α -amilaz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için amilaz aktivitesi 20°C ile 90°C arasında değişen farklı sıcaklık değerlerinde çalışılmıştır. Literatürde α -amilazlar için optimum sıcaklık değerleri büyüme sıcaklıkları ile de ilişkili olarak 25°C ile 130°C arasında çok farklı değerler almaktadır [4]. SDP1 α -

amilazının optimum sıcaklık değeri 60°C' olarak belirlenmiştir. *B.subtilis* SDP1 α -amilazı ile aynı optimum sıcaklık değerlerine sahip başka amilazlarda literatürde rapor edilmiştir [24, 80, 148-150]. İzolat SDP1 α -amilazı geniş bir sıcaklık aralığında aktivite gösterebilmektedir. Optimum sıcaklık değeri 60°C olmasına karşın 50°C ve 70°C'de de bağlı aktivitelerinin sırasıyla % 85 ve %89 olduğu belirlenmiştir. Ancak 70°C'den sonra aktivite değerinde hızlı bir düşüş gözlemlenmektedir (Şekil 3.17.).

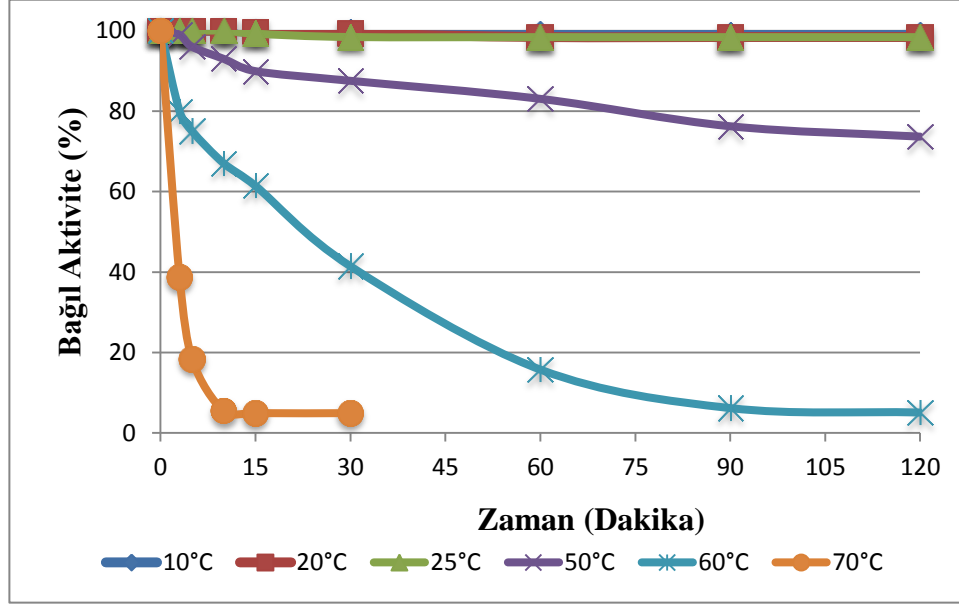


Şekil 3.17. Sıcaklığın SDP1 α -amilazının aktivitesi üzerine etkisi

α -amilaz enziminin termal kararlılığın belirlenmesi amacıyla, enzim örnekleri 10°C ile 70°C arasında değişen sıcaklık değerlerinde farklı zaman aralıklarında bekletilmiş, daha sonra buza alınarak soğutulmuş ve son olarak da kalan aktiviteleri bölüm 2.3.2.1 de verilen aktivite yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. t_0 anında ki enzim aktivitesi 100 olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.18.).

Enzimin 50°C'da, 1 saat ve 2 saatlik inkübasyonlar sonucunda, başlangıç aktivitesinin sırasıyla %83 ve %74'ünü koruduğu belirlenmiştir. 25°C ve ise 2 saat boyunca aktivite kaybı gözlenmemiştir (Şekil 3.18.). Enzim kararlılığı (5-20mM) Ca^{+2} iyonu varlığında incelendiğinde büyük bir farklılık gözlenmemiştir. *Bacillus sp. ferdowsicous* α -amilazı [19] *Bacillus brevis* MTCC 7521 α -amilazı [151], *Bacillus sp.*

KR-8104 α -amilazı [20], *Bacillus thermooleovorans* NP54 α -amilazı [79] ve *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 α -amilazları da [152] aktivite veya kararlılıkları için Ca^{+2} iyonuna ihtiyaç duymadıkları literatürde rapor edilmiştir.



Şekil 3.18. Farklı sıcaklıkların SDP1 amilazının termal kararlılığı üzerine etkisi

3.4.3. Metallerin ve denature ajanların α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Final konsantrasyon 5mM olacak şekilde farklı metal tuzlarının (CaCl_2 , ZnCl_2 , FeCl_3 , CuCl_2 , NiCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 , CoCl_2 and NaCl) SDP1 α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir (Tablo 3.6.).

Mangan klorürün enzim aktivitesine pozitif yönde etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç *Bacillus* sp BKL20 [153], *Bacillus halodurans* 38C-2-1 [154] ve *Bacillus subtilis* AX20 [130] amilazları ile ilgili yapılan çalışmalarda sonuçlarla uyum göstermektedir.

Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^{+} iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde büyük bir etkisi görülmezken, Fe^{+3} , Ni^{+2} , Cu^{+2} ve Co^{+2} iyonlarının, SDP1 amilaz enzimi üzerinde, inhibitör etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Bu metallerin varlığında, SDP1 amilazı başlangıç aktivitesinin yaklaşık %75'ini kaybetmektedir. *Bacillus* sp BKL20 [155], *Bacillus halodurans* 38C-2-1 [156] ve *Bacillus subtilis* AX20 [157] amilazları ile yürütülen çalışmalarda da benzer sonuçlar rapor edilmiştir.

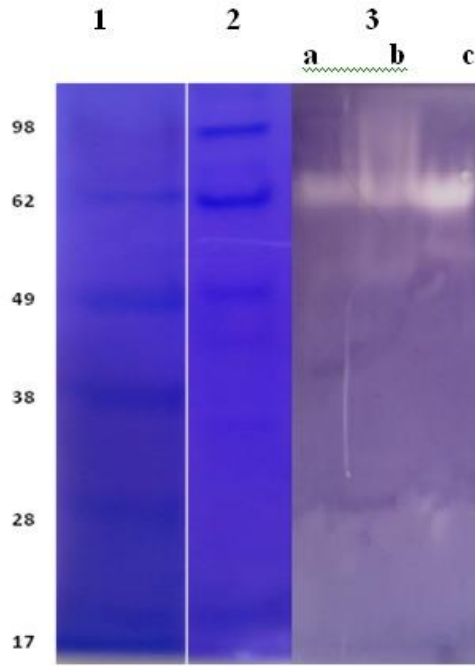
SDP1 α -amilazı Tween®20, Tween®80 and Triton™X-100 gibi iyonik olmayan deterjanların varlığında oldukça kararlı bir enzim olup başlangıç aktivite değerinin sırasıyla %86, %84 ve %81'ini koruyabilmektedir (Tablo 3.6.). SDS (%1 (w/v)) varlığında ise ham enzim başlangıç aktivitesinin %60'ını kaybetmektedir. Ca^{+2} içeren α -amilazların genellikle etilen diamin tetra asetik asid (EDTA)'e karşı çok hassas oldukları ve aktivite ve stabilitelerini kaybettikleri rapor edilmiştir. Literatürde, *Bacillus halodurans* 38C-2-1 [154] α -amilazının, 1 mM EDTA varlığında bile tüm aktivitesini kaybettiği belirtilirken. Hmidet ve ark., [158] 5mM EDTA varlığında *Bacillus mojavensis* A21 amilazının %88 aktivite kaybı yaşadığını rapor edilmiştir. Bu bulguların aksine SDP1 α -amilazı 5mM EDTA varlığında başlangıç aktivitesinin %82'sini korumaktadır. Ayrıca diğer bir enzim inhibitörü olan fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) varlığında (5mM) da aktivitesinin %88'ini korumaktadır. Bu da enzimin katalitik aktivitesi için tiyol veya karboksilik amino asitlere ihtiyaç duymadığını göstermektedir.

Tablo 3.6. Metallerin, denatüre ajanların ve enzim inhibitörlerinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

| Metal İyonları Denatüre Ajanlar ve Enzim İnhibitörleri | Kalan Aktivite (%) |
|---|---------------------------|
| Nativ Enzim | 100.00 |
| CaCl ₂ | 100.9 |
| ZnCl ₂ | 80.3 |
| MgCl ₂ | 92.6 |
| FeCl ₃ | 27.2 |
| CuCl ₂ | 25.5 |
| NiCl ₂ | 23.7 |
| MnCl ₂ | 130 |
| CoCl ₂ | 54.9 |
| NaCl | 95.9 |
| EDTA | 81,5 |
| PMSF | 87,5 |
| Triton X-100 | 81,0 |
| Tween 80 | 84,5 |
| Tween 20 | 86,2 |
| SDS | 38,4 |

3.4.4. Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve zimogram analizi

Literatürde 10 to 210 kDa arasında değişen çok farklı molekül ağırlığına sahip α -amilazların varlığı rapor edilmiştir [4]. Molekül ağırlıkları büyük farklılıklar göstermesine karşın α -amilazların moleküler büyüklükleri genellikle 50-65 kDa arasında değişmektedir [7, 159-162]. SDP1 α -amilazının molekül ağırlığı da 61 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 3.19.). Molekül ağırlığı belirlenen protein bandının amilolitik aktiviteye sahip olduğu zimogram metodu ile belirlenmiştir. (Şekil 3.19.).



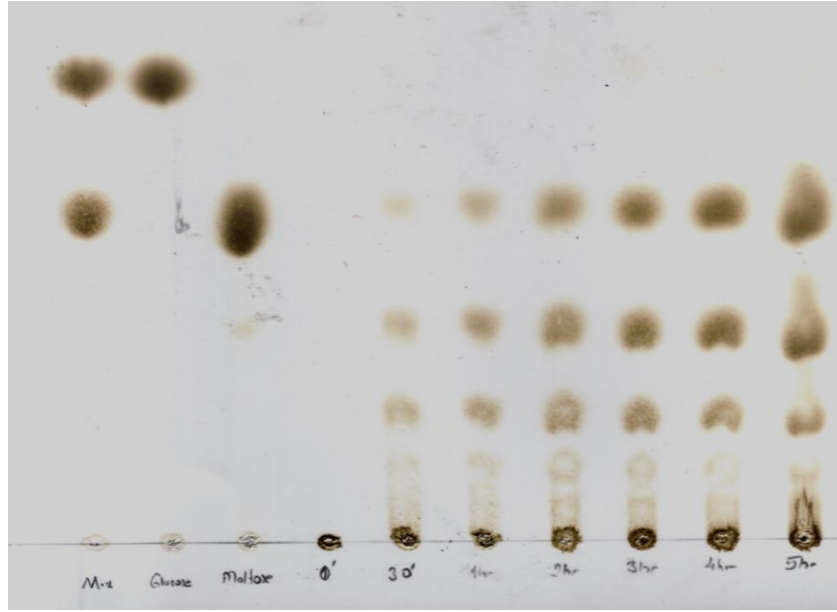
Şekil 3.19. SDP1 α -amilazının SDS-PAGE ve zimogram görüntüleri: 1)Marker (prestained sea blue marker); 2)SDS-PAGE; 3)Zimogram Ham enzim a); ultrafiltrason b); amonyum sülfat çöktürme c).

3.4.5. İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile nişasta hidroliz ürünlerinin belirlenmesi

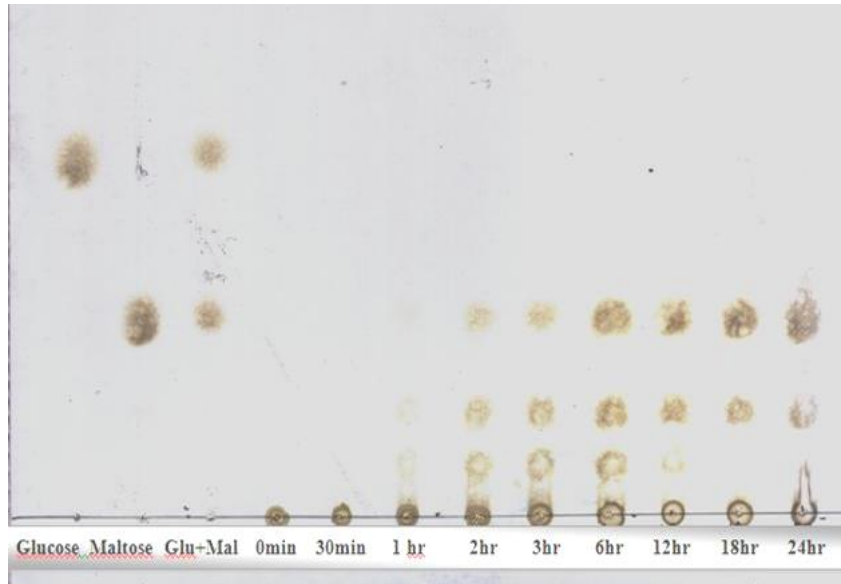
TLC çözülebilir nişastanın ve buğday nişastasının hidrolitik ürünlerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

TLC analizi açık bir şekilde çözünür nişastanın hidrolizi sonucunda oluşan ürünlerin maltoz (G2), maltotrioz (G3) ve maltotetraoz (G4) olduğunu göstermiştir (Şekil 3.20a.). Şekil3-20a.da da görüldüğü gibi, SDP1 amilazı başlangıçta çözülebilir nişastadan maltoheksoz (G6) oluşturmakta hidroliz ilerledikçe de maltoheksoz

maltotetroz, maltotrioz ve maltoza dönüşmektedir. Maltotrioz hidrolizin ilk 30 dakikasinda ortaya çıkıp, 5 saat süresince varlığını korumaktadır. Bu özellik SDP1 amilazının maltotrioz üreten bir enzim olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte maltoz oluşumu da zamanla artış göstermektedir. Çözülebilir nişastanın hidrolizi 24 saat süresince takip edildiğinde maltotriozun aynı miktarda kaldığı ancak maltotetrozun maltoza dönüşerek maltoz miktarının artışı belirlenmiştir (Şekil 3.20b.).



a

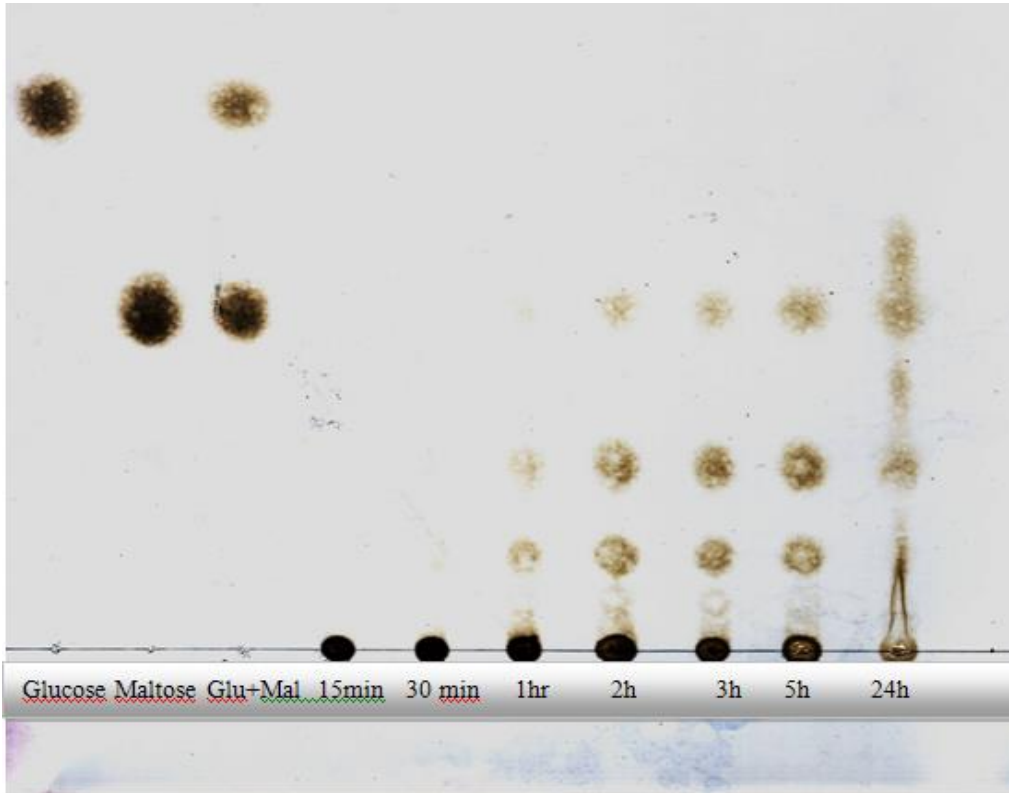


b

Şekil 3.20. Çözülebilir nişastanın ham SDP1 amilaz enzimi ile hidrolizi sonucu oluşan hidroliz ürünleri a) 5 saatlik inkübasyon b) 24 saatlik inkübasyon

Malto-oligosakkaritlein nişasta hidrolizati içindeki dağılımları nişastanın türüne göre farklılık göstermektedir. Çözülebilir nişasta ve patates nişastası geniş aralıkta (G1-G5) değişen malto-oligosakkarit ürünleri oluşturmaktadır. Buğday, pirinç ve mısır nişastalarından elde edilen nişastanın hidrolizi sonucunda ise genellikle daha küçük aralıkta ki (G1-G3) malto-oligosakkaritlerin ana ürün olarak oluştuğu rapor edilmiştir [163].

Buğday nişastasının ham SDP1 enzim ile hidrolizi sonucu elde edilen ürünler Şekil 3.21.'de verilmiştir. SDP1 amilazının buğday nişastasını hidrolizi sonucunda ana ürün olarak küçük oligosakkaritleri (G1-G3) oluşturmaktadır. 5 saatlik hidrolizin sonucunda ana ürünün maltoz yerine maltotrioz olduğu görülmektedir. Uzun süreli hidroliz reaksiyonu (24 saat) sonucunda bile maltotrioz stabilitesini korurken maltotetroz maltoza dönüşmektedir.



Şekil 3.21. Buğday nişastanın ham SDP1 amilaz enzimi ile hidrolizi sonucu oluşan hidroliz ürünleri

SDP1 amilazının hidrolitik ürün profili diğer maltooligosakkarit (MOS) oluşturan amilazlardan farklılık göstermektedir. Büyük MOS oluşturan birçok

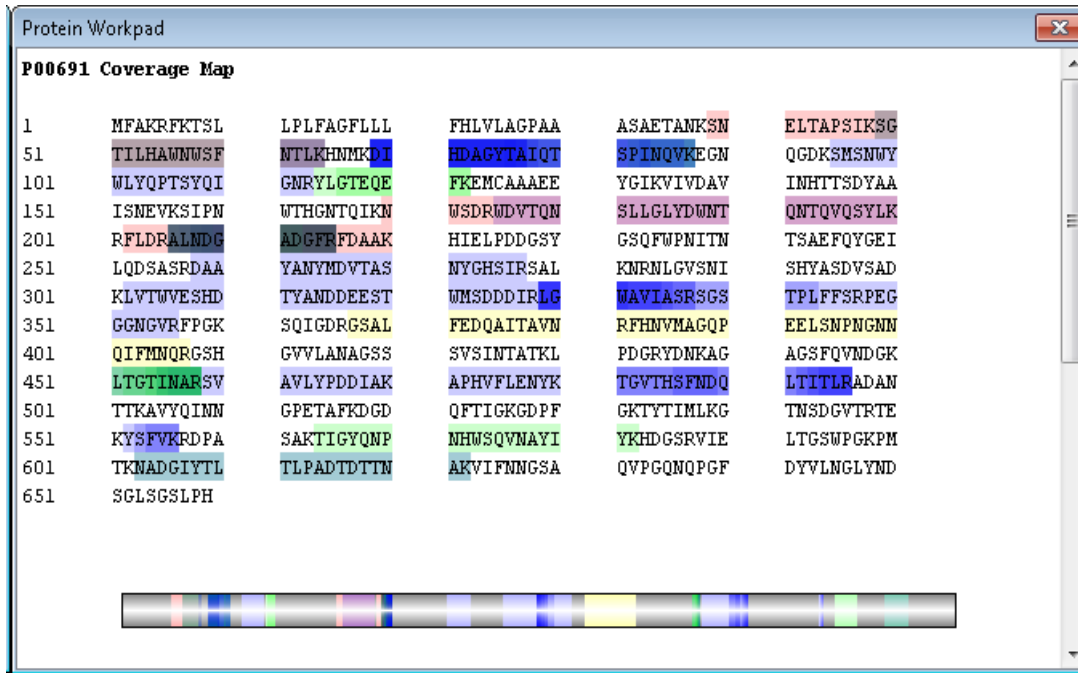
bakteriyel amilaz literatürde rapor edilmiştir. Bunlara örnek olarak maltoheksoz-oluşturan α -amilase üreten *Bacillus stearothermophilus* US100 [43] ve *Bacillus halodrans* LBK [42], maltopentoz-oluşturan amilaz üreten *Pseudomonas sp.* KO-8940 [164] ve *Bacillus. circulans* [15] verilebilir. *Bacillus sp* GM8901[44] ve *Bacillus subtilis* KCC103 [147] ‘den izole edilen ve maltotrioz ve maltotetraoz gibi küçük MOS oluşturan az sayıda izolat literatürde rapor edilmiştir.

3.4.6. Amilaz enziminin LC/MS/MS ile belirlenmesi

SDS-PAGE jelinden kesildikten sonra in jel-digestion metodu ile peptitlerine ayrılan protein, LC/MS/MS cihazı yardımı ile incelenmiştir. Elde edilen peptit kütle haritası SDP1 amilazının tanılanması için kullanılmıştır. Elde edilen peptit datası Protein Lynx Global Server (PLGS) programı kullanılarak kapsamlı nonredundant protein sekans veritabanında (NCBIInr) taranmıştır. Analiz sonucunda SDP1 amilazı *Bacillus subtilis* AMYBACSU (P00691(UniProt)) α -amilazı ile benzerlik göstermiştir. Peptid eşleşmesi %49.9 olup PLGS skoru 6875.22 dir (Tablo 3.7.). Peptit karşılaştırma haritası ise Şekil 3-22.’de verilmiştir5

Tablo 3.7. LC/MS/MS analizi

| Accession | Entry | Description | Mw(Da) | pI(pH) | PLGS Score | Peptides | |
|----------------------|-------------|---|-----------|----------|-----------------|-------------------|-------------------------------|
| P00691 | P00691 | AMY BACSU Alphaamylase OS Bacillus subtilis GNamy EPE 1 SV2 | 72333 | 5,7631 | 6875,22 | 84 | |
| Theoretical Peptides | Coverage(%) | Precursor Mass (ppm) | RMS Error | Products | Digest Peptides | Modified Peptides | Products RMS Mass Error (ppm) |
| 43 | 49,92 | 6,3297 | | 871 | 27 | 8 | 0,02 |



Şekil 3.22. Peptit karşılaştırma haritası

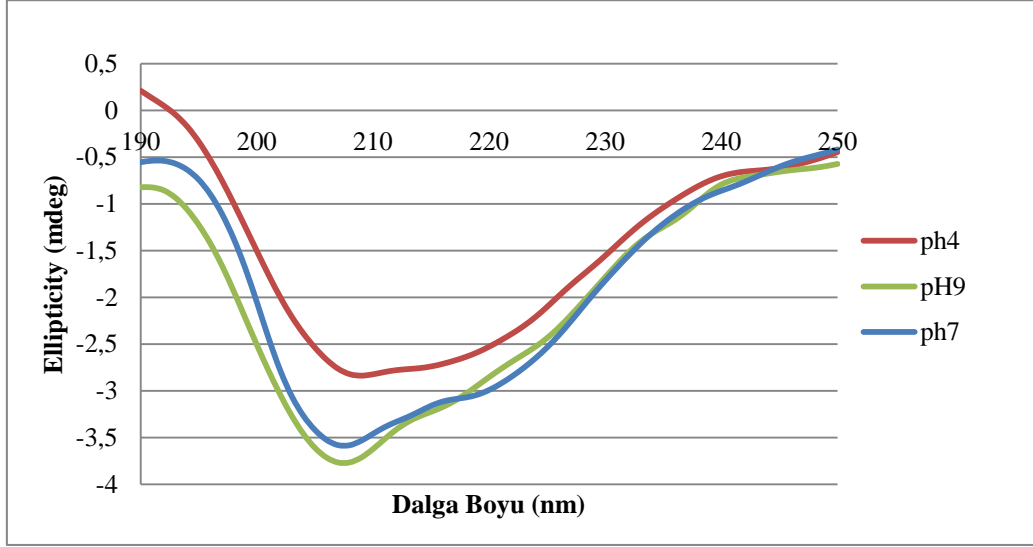
SDS-PAGE jeli üzerinden kesilen farklı bir bantın analizi sonucunda bu proteinin katalaz proteini olduğu belirlenmiştir. (Tablo 3.8.). SDP1 katalaz enziminin *Bacillus subtilis* strain 168 katalazı ile %80,12 sekans benzerliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Katalaz testi sonucunda da katalaz pozitif olarak belirlenen SDP1 izolatu ile ilgili elde edilen bu sonuç LC/MS/MS analiz ile de teyit edilmiştir.

Tablo 3.8. Katalaz enzimi için LC/MS/MS sonucu

| Accession | Entry | Description | Mw(Da) | pI(pH) | PLGS Score | Peptides |
|----------------------|--------------|--|----------|-----------------|-------------------|-------------------------------|
| P26901 | P26901 | CATA BACSU Vegetative catalase OS Bacillus subtilis strain 168 GN katA PE 1 SV 5 | 54757 | 6,0674 | 16624,51 | 148 |
| Theoretical Peptides | Coverage (%) | Precursor RMS Mass Error (ppm) | Products | Digest Peptides | Modified Peptides | Products RMS Mass Error (ppm) |
| 37 | 80,1247 | 6,3889 | 1593 | 46 | 12 | 0,016097 |

3.4.7. Amilaz enziminin ikincil yapısının dairesel dikroizm spektroskopisi ile belirlenmesi

SDP1- α -amilazının yapısal karakterizasyonu dairesel dikroizm spektroskopisi yöntemi ile çalışılmıştır. SDP1- α -amilazının pH 7.0 ve 25°C 'de çekilen CD spektrasına göre 208 nm gözlenen bant ağırlıklı olarak α -heliks yapısı ile ilişkilendirilmektedir (Şekil 3.23.)

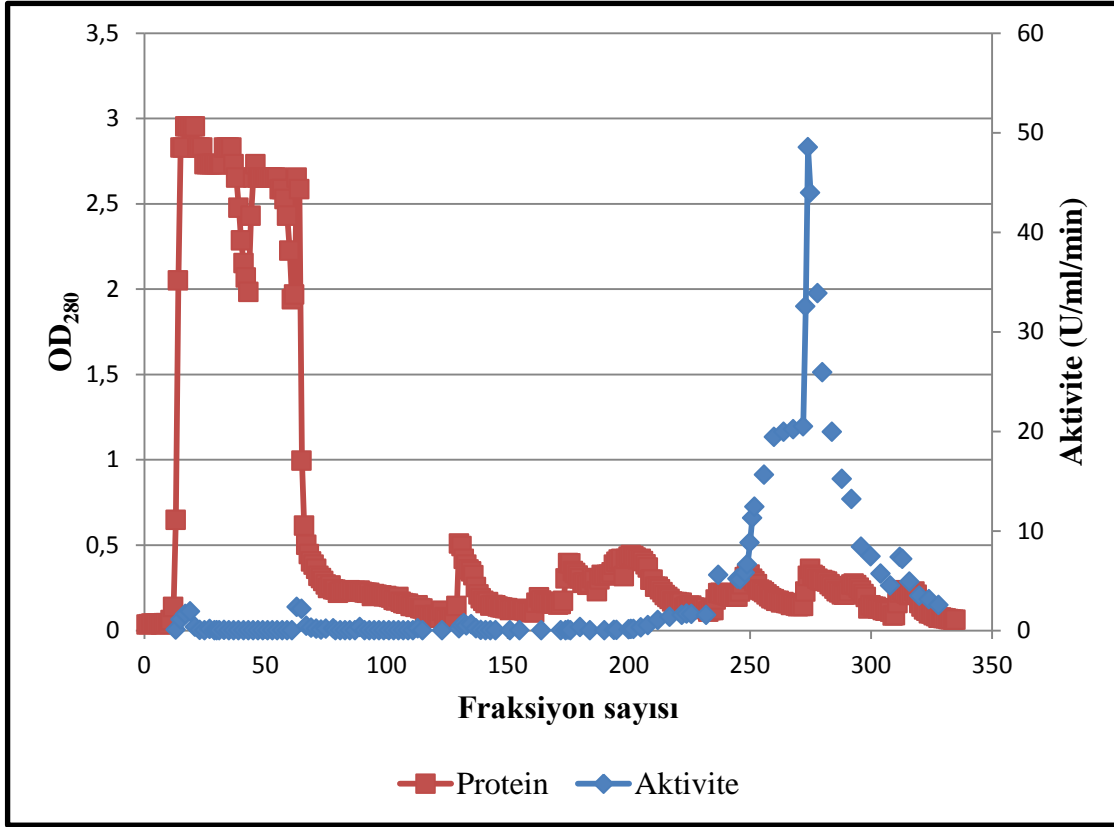


Şekil 3.23. SDP1 amilazının farklı pH'lardaki CD sonucu

3.5. *Bacillus subtilis* SDP1 α -amilaz enziminin saflaştırılması

Tez kapsamında, izolat SDP1'den üretilen α -amilaz enziminin saflaştırılmasında farklı stratejiler denenmiştir. Saflaştırma sırasında ilk önce ultrafiltrasyon (fermentasyon sıvısı 30.000 cut-off değerindeki nitroselüloz membranlarından geçirilerek konsantre edilmiştir) ile konsantre edilen örnek DEAE-selüloz anyon değiştirme kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. DEAE selüloz anyon değiştirme kromatografisi sonuçları Şekil 3.24.'de verilmiş ve saflaştırma basamakları Tablo 3.9.'da özetlenmiştir.

Saflaştırma sonucunda ham fermentasyon sıvısı yaklaşık % 26 verim ile 9,9 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin spesifik aktivitesi 191.8 U mg⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Enzimin saflığı SDS-PAGE elektroforezi yardımı ile de belirlenmiştir (Şekil 3.25.).



şekil 3.24. DEAE selüloz anyon değiştirici kromatografisi sonucu

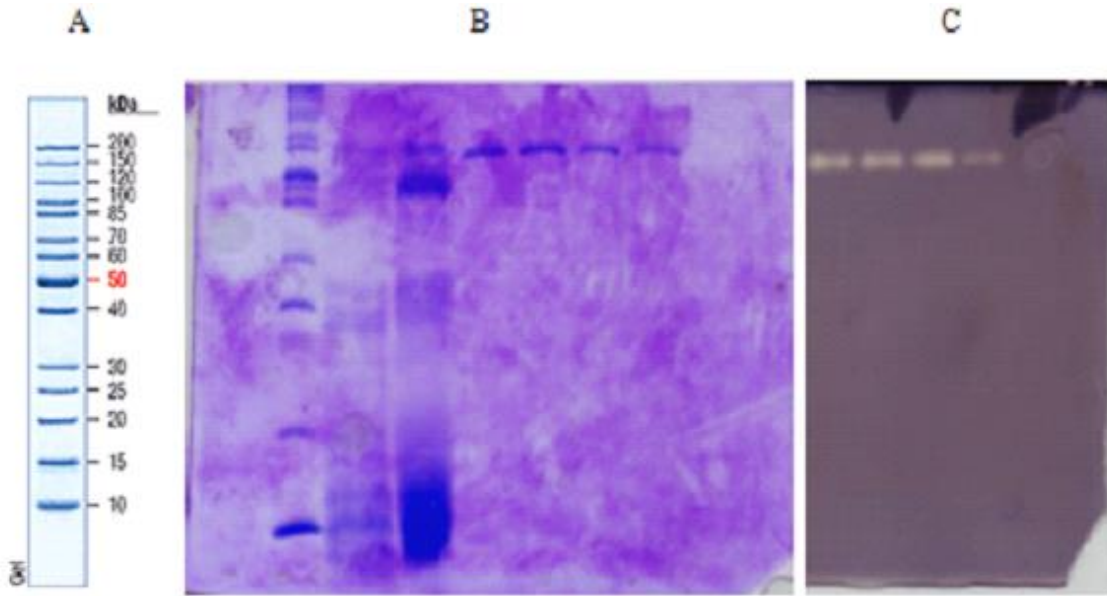
Tablo 3.9. SDP1 α -amilazın saflaştırma tablosu

| P1 amylase | Toplam Akt. (U) | Toplam Protein (mg) | Spesifik Act. (U/mg) | Verim | Saflaştırma Katsayısı |
|-----------------------|-----------------|---------------------|----------------------|-------|-----------------------|
| Ham Enzim | 6635.9 | 342.51 | 19.37 | 100 | 1 |
| Ultrafiltrasyon | 6282.6 | 289.82 | 21.67 | 94.68 | 1.12 |
| Kolon Çıktısı 260-272 | 1722.05 | 8.98 | 191.8 | 25.95 | 9.9 |

Messaoud ve ark (2004) [41], *Bacillus subtilis* US116 izolatından elde ettikleri maltoheksoz ve maltoheptoz üreticisi α -amilaz enzimini, aseton çöktürmesi, kütle ayırma HPLC ve iyon değiştirme FPLC metodlarını kullanarak %26.5 verim ile 56 kat saflaştırmışlardır. Michelin ve ark (2010) [165], DEAE selüloz iyon değiştirme ve sephadex G100 jel filtration metodlarını kullanarak *Paecilomyces variotii*'den izole ettikleri 612.5 U mg^{-1} spesifik aktiviteye sahip amilaz enzimini %8,9 verim ile 63,1 kat

saflaştırmayı başarmışlardır. Sajedi ve ark., [20] 2005 yılında, *Bacillus* sp. KR8104 α -amilaz enzimin DEAE selüloz anyon değiştirme kromatografisi ve Fenil Sefaroz kolonu ile saflaştırmış ve daha sonra ultrafiltrasyon ile konsantre etmişlerdir. Saflaştırma sonucunda 30 kat saflaşan enzimin spesifik aktivitesi 11 U mg⁻¹ den 30 U mg⁻¹'e yükselmiştir. Kumar ve Khare (2012) *Marinobacter* sp EMB8 izolatından elde ettikleri amilaz enzimini %52 verim, 76 kat saflaştırırken DEAE selüloz ve Sephadex G-75 kolon kromatografilerini kullanmışlardır.

Bu tez çalışmasında elde edilen enzimin saflaştırma verimi ve saflaştırma katsayısı literatür ile karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçlar literatür ile benzerlik göstermektedir. Bazı değerlere göre, saflaştırma verimi ve katsayısı düşük olmasına rağmen, SDS PAGE elektroforezde elde edilen tek bant enzimin saflaştırıldığını göstermektedir.



şekil 3.25. Kolon ıktılarını %15 SDS-PAGE ve zimogram ile incelenmesi 1Marker SM0661, 2- Fermentasyon sıvısı, 3- Ultrafiltrasyon, 4- Fraksiyon #260, 5- Fraksiyon#264, 6- Fraksiyon #267, 7- Fraksiyon #270,

3.5.1. Amilaz enzim saflaştırmasında manyetit-aljinat kürelerinin kullanılması

Bu tez çalışmasında amilazın saflaştırılması için amilazın aljinata olan afinitesinden yararlanılması da planlanmıştır. Ayrıca mikro kürelere manyetik özellik kazandırılarak bir mıknatıs yardımı ile kolayca ortamdaki uzaklaştırılabilmeleri hedeflenmiştir.

Alginatlar mannuronik ve guluronik asid içeren polisakkaritlerdir. Doğal olarak oluşan bu biyopolimerlerin biyolojik bilimlerde ve biyoteknoloji alanında (çeşitli protein ve hücrelerin tutuklanmalarında ve/veya taşınmalarında matrix yapılar oluşturması) çok çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır. Yiyecek ve içecek sektöründe de kıvam artııcı ve gelleştirme ajanları olarak kullanılmaktadırlar [166]. Alginatlar, matriks içerisinde göreceli olarak hareketsiz bir sulu ortam sağlarlar ve gel de oluşan büyük gözenekli yapılar makromoleküllerin yüksek difüzyon hızlarına izin verir. Roy ve arkadaşları (2000) [167] çalışmaları sonucunda, alginatların amilazlara karşı beklenmeyen bir affinite gösterdiklerini belirlemişlerdir. Biyoteknolojik uygulamalarda alginatlar genel olarak iğneli şırıngalar ile oluşturulan küreler şeklinde kullanılmaktadır. Bu kürelerin şekil ve çapları kullanılan iğnenin boyutları ve aljinat solüsyonunun viskozitesi ile doğrudan ilişkilidir [168]. Çapları 0,2 mm olan alginat mikrokürelerinin hazırlanmasında atomizasyon, spreyleme ve yağ içinde su emulsifikasyonu gibi iyi bilinen metodlar kullanılmaktadır [169].

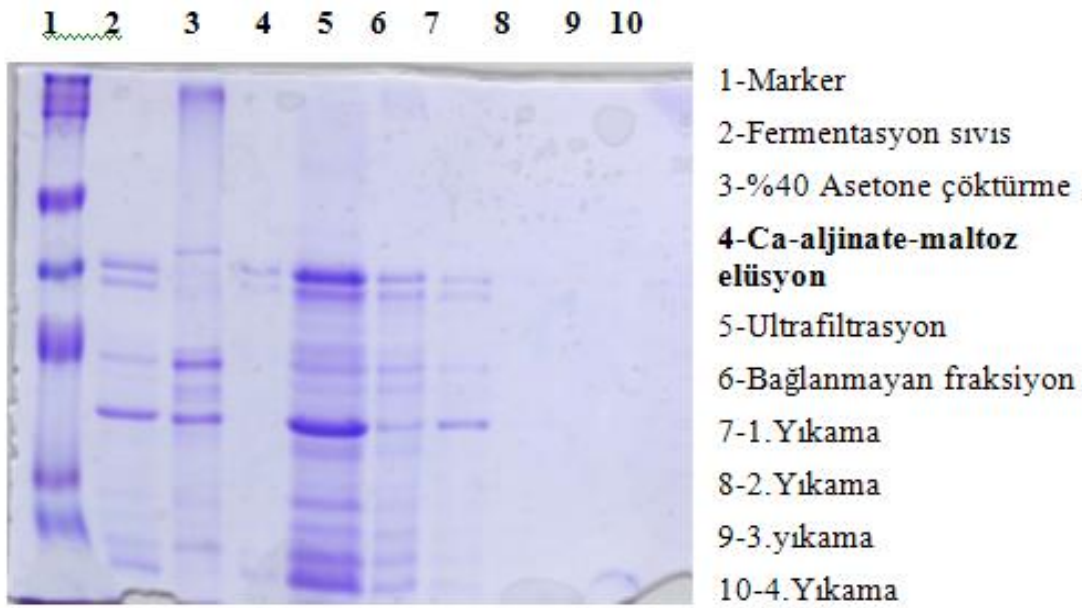
Demir manyetik materyaller ile birleştirilmiş alginat küreleri birçok farklı uygulamada kullanılabilir umut vadeden malzemelerdir. Manyetik olarak modifiye edilen küreler kolaylıkla hariçi bir manyetik alan kullanılarak manipüle edilebilirler ve bu sayede genelde viskoz olan biyolojik besi ortamları ile çalışırken kullanılabilirler [166].

Manyetik aljinat küreleri amilaz, glukoamilaz, ve pullunaz gibi çeşitli nişasta parçalayıcı enzimlerin affinite ayrımlarında kullanılmaktadır. *Bacillus amyloliquefaciens* den elde edilen glukoamilazın saflaştırılması affinite çöktürmesi ile yapılmıştır [170]. Ayrıca maya hücrelerinin immobilizasyonu ve affinite ligandlarının immobilizasyonunda da manyetik alginat küreleri kullanılmıştır [166].

Manyetik aljinat mikro küreleri ile yapılan saflaştırma sonucunda SDP1 α -amilaz enzimi 3.86 kat saflaştırmıştır (Tablo 3.10.). SDS–PAGE analizlerinde de aljinat mikrokürelerin amilaz enzimine daha spesifik olarak bağlandıkları görülmüştür (Şekil 3.26.). Ancak amilaz bandının altında bulunan protein de amilaz gibi mikrokürelere bağlanabilmektedir. İlerde yapılacak çalışmalar ile bağlanma kapasitesinin artırılması sonucunda verimin yükseltilebileceği düşünülmektedir.

Tablo 3.10. Manyetit aljinat küreleri kullanılarak yapılan saflaştırma tablosu

| | Aktivite (U) | Toplam Protein (mg) | Spesifik Aktivite (U/mg) | Verim (%) | Saflaştırma Katsayısı |
|---------------------|--------------|---------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|
| Ham Enzim | 360.93 | 1.12 | 322.26 | 100 | 1.00 |
| Supernetant* | 211.77 | 1.00 | 211.77 | 65.71 | 0.66 |
| Elüsyon | 149.16 | 0.12 | 1243.00 | 41.33 | 3.86 |



Şekil 3.26. Manyetik aljinat mikroküreleri ile yapılan saflaştırma çalışmasının SDS-PAGE ile kontrolü

4. SONUÇLAR

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- a. Çukurova Üniversitesinden Prof.Dr. Sadık Dinçer ve ekibi tarafından akasya ağacı rizosferinden izole edilen bakterinin amilaz, selüloz, fitaz, ksilanaz farklı endüstriyel öneme sahip enzimleri sentezleyebildiği bulunmuştur.
- b. İzolat SDP1 hem konvansiyonel hem de moleküler teknikler kullanılarak tanılanmıştır. Bu analizler sonucunda izolat SDP1 ile tip tür *Bacillus subtilis* DSM 10^T arasında, küçük fenotipik farklılıklar bulunmasına rağmen, 16S rRNA dizisi ve yağ asitleri analiz sonuçlarına göre izolat *Bacillus subtilis* olarak tanılanmıştır.
- c. İzolat SDP1 *Bacillus subtilis* strain SDP1 16s ribosomal RNA gene” adı ile NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası’na **HM235916** kayıt numarası ile kaydettirilmiştir.
- d. Enzim üretiminin büyümeye bağlı olduğu ve en yüksek üretime fermentasyonun 36.ncı saatinde ulaşıldığı bulunmuştur.
- e. Amilaz üreticisi olduğu belirlenen SDP1 izolatu için besiyeri ve fiziksel koşulların optimizasyonu yapılarak enzim üretimi arttırılmıştır. En iyi karbon kaynağı olarak nişasta, en iyi azot kaynağı olarak da maya özütü belirlenip yeni üretim formülasyonu hazırlanmıştır.
- f. İzolat SDP1 tarafından üretilen α -amilaz enziminin 61kDa molekül ağırlığına sahip olduğu, optimum sıcaklık ve optimum pH değerlerinin sırasıyla 60°C ve pH7.0 olduğu belirlenmiştir.
- g. Enzimin 50°C ‘de kararlılığını uzun süre korurken 70 dereceden sonra aktivitesini hızla kaybettiği bulunmuştur.
- h. Enzimin nişasta hidrolizi TLC ile incelenmiş ve SDP1 izolatının maltooligosakkarit üreten bir amilaz olduğu 12 saatlik hidrolize kadar ana ürünlerin maltoz, maltotrioz ve maltotetroz olduğu belirlenmiştir. Ancak 12 saat sonunda maltotetroz maltoza dönüşmeye başladığı belirlenmiştir. Ancak maltotriozun 24 saatlik inkübasyon sonunda bile kararlılığını koruduğu ve enzimin maltotrioz üreticisi olduğuda belirlenmiştir.
- i. SDP1 α -amilazın varlığı zimogram ve LC/MS/MS analizler ile de teyit edilmiş. PLGS yazılımı ile yapılan veritabanı sonucunda da SDP1 amilazının *Bacillus subtilis* AMYBACSU (P00691(UniProt)) α -amilazı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir..

- j. Amilaz enziminin saflaştırılması DEAE selüloz kolonu ile NaCl gradienti (0-250mM) uygulanarak yapılmıştır. Enzim başlangıça göre yaklaşık % 26 verim ile 9,9 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin spesifik aktivitesi 191.8 U mg⁻¹ olarak hesaplanmıştır.
- k. Amilaz enzimin saflaştırılması için aljinat ve manyetik aljinat mikroküreleri sentezlenmiştir. Manyetik aljinat mikroküreleri kullanılarak yapılan saflaştırma işleminde enzim başlangıça göre 3.8 kat saflaştırılabilmektedir.
- l. 70°C’de 10 dakika inkübe edilen aljinat mikrokürelerine bağlı amilaz enzimin aktivitesinin % 35’ini korunduğu gözlenmiştir. Ham enzim ile yapılan thermal aktivite denemesinde 10 dakika sonucunda enzim aktivitesinin %95’inin kaybolduğu gözlenmiştir. Buna göre mikroküreye bağlanmış enzim aktivitesinin bağlanmamış enzime göre aktivitesini 7 kat fazla korunduğu belirlenmiştir.
- m. Ca⁺² iyonuna ihtiyaç duymaması ve nişastanın hidrolizi sonucunda küçük maltooligosakkaritler üretebilmesi *Bacillus* SDP1 amilazını özellikle gıda endüstrisi için potansiyel ve iyi bir aday yapmaktadır.
- n. Maltotrioz ve maltotetroz ile birlikte maltoz da ürettiği belirlenen SDP1 amilazından, maltotrioz ve maltotetraoz üretim veriminin artırılması, hidroliz koşullarının optimizasyonu ve farklı nişastaların kullanılması ile başarılabılır.
- o. Diğer maltotrioz ve maltotetraoz üreticileri ile SDP1 amilazı karşılaştırıldığında proteinlerin molekül ağırlıkları, optimum sıcaklık ve pH değerleri vb. başlıklarda büyük farklılıklar gösterdikleri belirlenmiştir (Tablo 4.1.)

Tablo 4. 1. Maltooligosakkarit üreticilerinin karşılaştırılması

| Organizma | MW(KDa) | Optimum sıcaklık (°C) | pH Aralığı | İnhibitor |
|---------------------------------|---------|-----------------------|------------|--|
| <i>Bacillus subtilis</i> SDP1 | 61 | 60 | 5.0-8.0 | Ca ²⁺ stabilite ve aktivite üzerinde etkili değil |
| <i>Bacillus sp</i> GM8901 | 97 | 50 | 6.0-13.0 | 1mM EDTA 1mM PMSF |
| <i>Bacillus subtilis</i> KCC103 | 53 | 65-70 | 5.0-7.0 | Ca ²⁺ stabilite ve aktivite üzerinde etkili değil |
| <i>Marinobacter sp.</i> EMB8 | 72 | 80 | 6.0-11.0 | 1 mM EDTA |

EKLER

EK 1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Boyalar

ÇÖZELTİ 1. %1' lik Kongo Kırmızısı

| | |
|------------|--------|
| Kongo red | 1 gr |
| Distile su | 100 ml |

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

ÇÖZELTİ 2. Gram İyodür Çözeltisi

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

İyot ve potasyum iyodür, havanda iyice toz haline getirilmiş ve üzerine yavaş yavaş su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır [109] .

ÇÖZELTİ 3. Gram'ın Kristal Violet Boyası

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

20 ml etanolde 2 gr kristal violet boyası çözülmüştür. Ayrı bir kap içinde 80 ml distile suda 0.8 gr amonyum oksalat karıştırılmış ve bu çözelti boya çözeltisine ilave edilmiştir [109].

ÇÖZELTİ 4. Gram'ın Safranin Boyası

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

Safranin, etanolde çözülüp, distile su ilave edilerek iyice karıştırılmış ve sonra filtre kağıdından süzümüştür [109].

ÇÖZELTİ 9. %3'lük H₂O₂

Katalaz denemesinde kullanılmıştır.

ÇÖZELTİ 10. DNS çözeltisi

| | |
|-----------------------|-------|
| Dinitrosalisilik asit | 1 gr |
| 2N NaOH | 20 ml |
| dH ₂ O | 50 ml |
| Rochele Tuzu | 30 gr |

(Sodyum Potasyum Tartarate + 100 ml dH₂O ile tamamla) kullanılmıştır.

ÇÖZELTİ 11. %1 'lik Nişasta çözeltisi

Nişasta çözeltisi: 1 gr çözünebilir nişasta 100 ml 20 mM fosfat tamponu pH 6,9 içinde çözülür.

EK 2. SDS-Poliakrilamit Jel'de kullanılan çözeltiler

% 30 Bis-akrilamit çözeltisi: 29 g akrilamit ile 1 g N-N'-metilen-bis-akrilamit tartılarak 100 ml dH₂O içinde çözüldü. 4°C'de saklandı.

4X Yığılama Jeli Çözeltisi (pH 6.8) (50 ml) : 3.0275 g Tris baz (0.5 M), 0.2 g SDS (% 0.4) tartılarak dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı. pH 6.8' e HCl ile ayarlanır.

4X Ayırma Jeli Çözeltisi (pH 8.8) (50 ml) : 9.09 g Tris baz (1.5 M), 0.2 g SDS (% 0.4) tartılarak dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı. pH 8.8' e HCl ile ayarlandı.

N,N,N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) : Sigma , Kat. no. T-1233

% 10 Amonyum Persülfat Çözeltisi (APS) : 0.1 g amonyum persülfat 1 ml dH₂O içinde çözüldü. Küçük hacimler halinde -20 °C derin dondurucuda saklandı.

Ayırma (Separating) Jeli % 7.5 (5 ml) : 2.450 ml dH₂O, 1.25 ml 4X ayırma jel çözeltisi (1.5 M Tris pH 8.8 + % 0.4 SDS), 1.25 ml akrilamit-bis (% 30) bir nuçe erleni

içerisinde karıştırıldı ve 15 dakika vakum altında havası uzaklaştırıldıktan sonra 50 µl APS (% 10) ve 5 µl TEMED ilave edildi.

Yığınlama (Stacking) Jeli % 4 (2.5 ml) : 1.55 ml çift-distillenmiş H₂O, 0.625 ml 4X yığınlama jel çözeltisi (0.5 M Tris pH 6.8 + % 0.4 SDS), 0.335 ml akrilamit-bis (% 30) bir nuçe erleni içerisinde karıştırıldı ve 15 dakika vakum altında havası uzaklaştırıldıktan sonra 25 µl APS (% 10) ve 5 µl TEMED ilave edildi.

6X Yükleme Tamponu (Sample Buffer) (10 ml) : 7 ml 4X yığınlama jeli çözeltisi, 3.6 ml gliserol, 1 g SDS, 1.2 mg bromfenol mavisi dH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı. 5-10 dakika kaynatıldı.

Protein Yükleme Tamponu: 100 µl 6X yükleme tamponu içine 4 µl β-merkaptotanol eklendi.

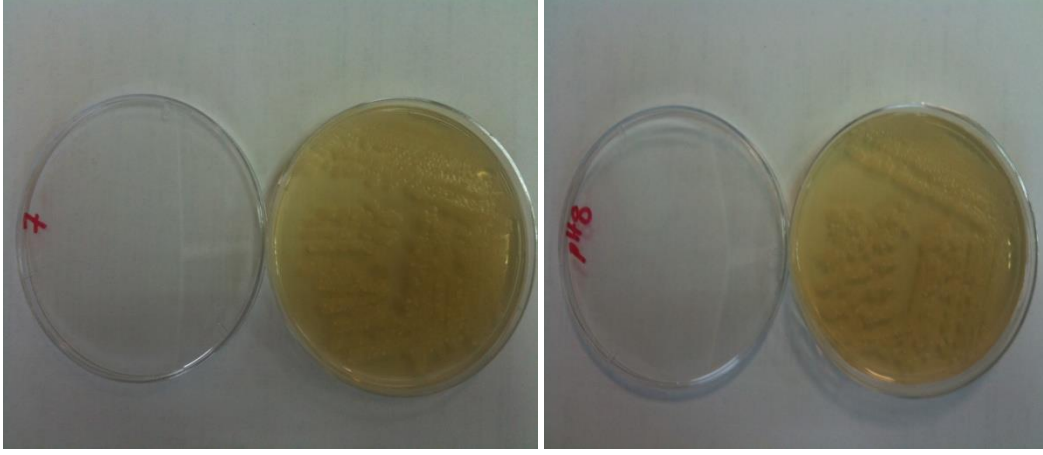
% 10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (100 ml) : 10 g SDS hafifçe ısıtılan 100 ml dH₂O'da çözüldü.

10X Elektroforez Yürütme Çözeltisi (Running Buffer) (200 ml): 6.055 g Tris baz (50 mM), 82 g glisin (384 mM) dH₂O'da çözüldü. 200 ml'ye dH₂O ile tamamlandı.

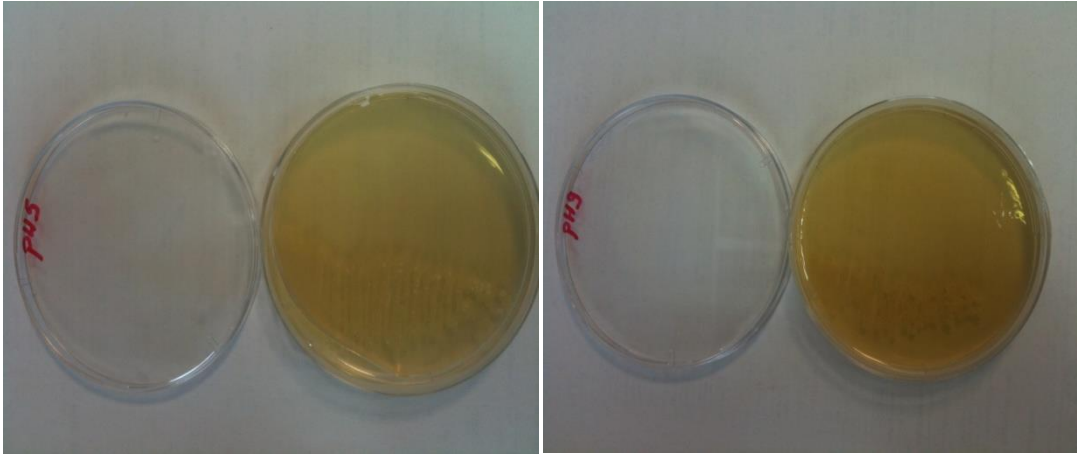
1X Elektroforez Yürütme Çözeltisi: 100 ml 10X Elektroforez Yürütme Çözeltisine 5 ml % 10 SDS eklendi ve dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

Protein molekül ağırlığı belirteci: 14.4 – 116.0 kDa aralığında , MBI Fermentas. Kat. no. #SM0431.

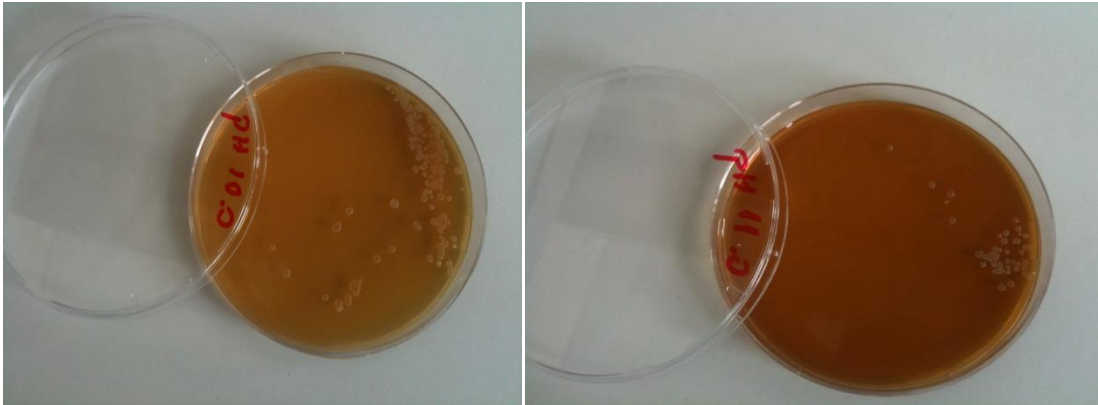
EK 3. SDP1 izolatının katı besiyerinde farklı pH'lar ve sıcaklıklarda ki büyüme sonuçları



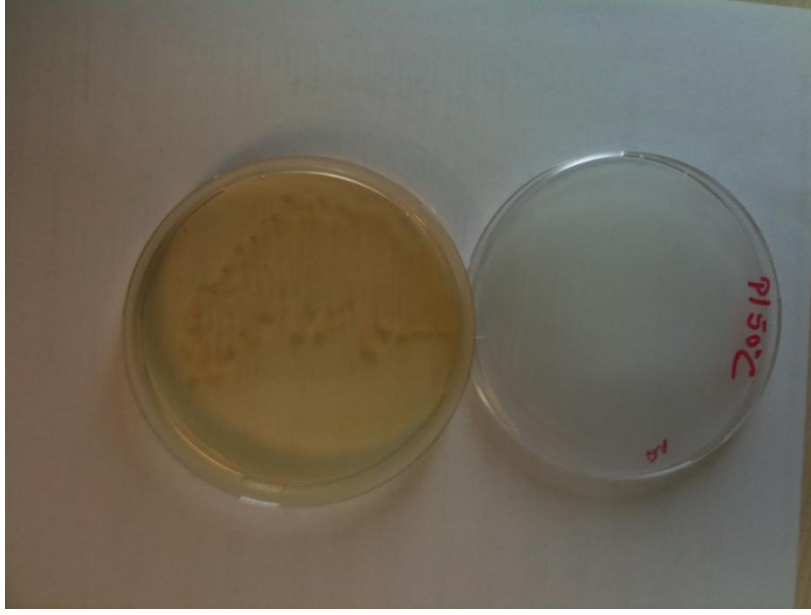
Şekil E3. 1 pH 7 ve pH 8 de büyüme



Şekil E3. 2 pH 5 ve pH 9 de büyüme



Şekil E3. 3 pH 10 ve pH 11de büyüme



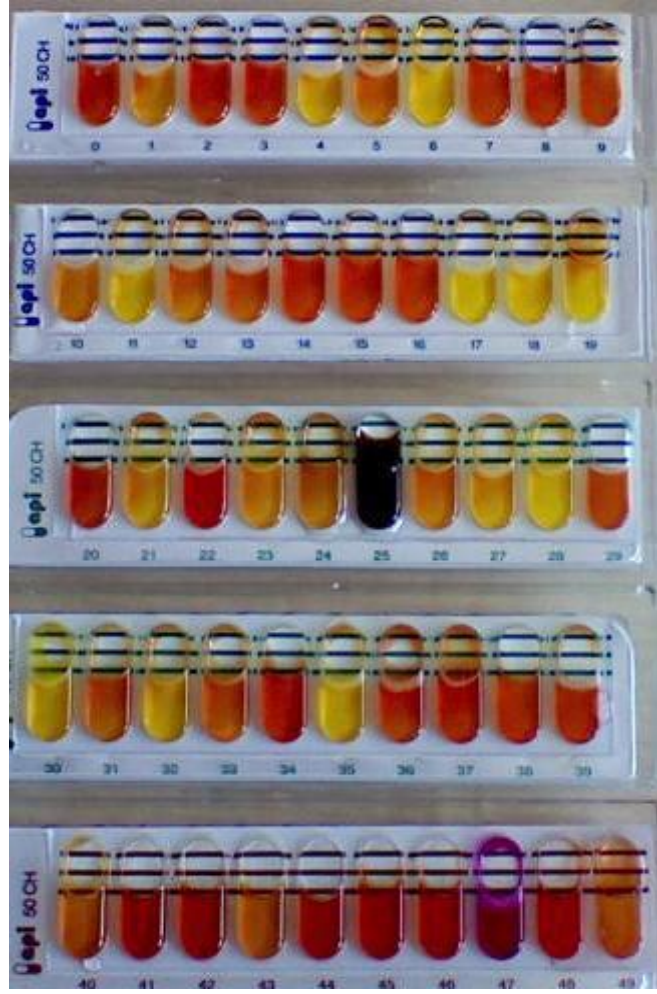
Şekil E3. 4 SDP1 izolatının 50°C 'de büyümesi

EK 4. API ve VITEK Analiz Sonuçları



| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|--|
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | |
| ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX | NO2 | N2 | MOB | |
| + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | | + | - | | |
| 1 | | | 2 | | | 0 | | | 6 | | | 0 | | | 2 | | | 0 | | | 1 | | | |

Şekil E4. 1 API 20E test sonucu



Şekil E4. 2 SDP1 izolatına ait 48 saatlik API 50CHB sonucu

| TESTS | SUBSTRAT | REACTION TESTED | -RESULTS *negative* | + RESULTS *positive* |
|--------------|------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| ONPG | ONPG | beta-galactosidase | colorless | yellow |
| ADH | arginine | arginine dihydrolase | yellow | red/orange |
| LDC | lysine | lysine decarboxylase | yellow | red/orange |
| ODC | ornithine | ornithine decarboxylase | yellow | red/orange |
| CIT | citrate | citrate utilization | pale green/yellow | blue-green/blue |
| H2S | Na thiosulfate | H2S production | colorless/gray | black deposit |
| URE | urea | urea hydrolysis | yellow | red/orange |
| TDA | tryptophan | deaminase | yellow | brown-red |
| IND | tryptophan | indole production | yellow | red (2 min.) |
| VP | Na pyruvate | acetoin production | colorless | pink/red (10 min.) |
| GEL | charcoal gelatin | gelatinase | no diffusion of black | black diffuse |
| GLU | glucose | fermentation/oxidation | blue/blue-green | yellow |
| MAN | mannitol | fermentation/oxidation | blue/blue-green | yellow |
| INO | inositol | fermentation/oxidation | blue/blue-green | yellow |
| SOR | sorbitol | fermentation/oxidation | blue/blue-green | yellow |
| RHA | rhamnose | fermentation/oxidation | blue/blue-green | yellow |
| SAC | sucrose | fermentation/oxidation | blue/blue-green | yellow |
| MEL | melibiose | fermentation/oxidation | blue/blue-green | yellow |
| AMY | amygdalin | fermentation/oxidation | blue/blue-green | yellow |
| ARA | arabinose | fermentation/oxidation | blue/blue-green | yellow |
| OX | oxidase | oxidase | colorless/yellow | violet |

Şekil E4. 3 API 20E Değerlendirme Tablosu

bioMerieux Customer:
System #: 4888

Laboratory Report

Printed Apr 26, 2009 10:23 CDT
Printed by: bio

Isolate Group: MAM1-1

Bionumber: 1270171555447260

Selected Organism: Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/atrophaeus

| Biochemical Details | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------|---|----|------|---|----|-------|-----|----|---------|-----|----|-----------|-----|----|------|---|
| 1 | BXYL | + | 3 | LysA | - | 4 | AspA | - | 5 | LeuA | (-) | 7 | PheA | (+) | 8 | ProA | - |
| 9 | BGAL | + | 10 | PyrA | + | 11 | AGAL | + | 12 | AlaA | - | 13 | TyrA | (-) | 14 | BNAG | - |
| 15 | APPA | + | 18 | CDEX | - | 19 | dGAL | - | 21 | GLYG | + | 22 | INO | + | 24 | MdG | + |
| 25 | ELLM | + | 26 | MdX | - | 27 | AMAN | - | 29 | MTE | + | 30 | GlyA | - | 31 | dMAN | + |
| 32 | dMNE | + | 34 | dMLZ | - | 36 | NAG | (+) | 37 | PLE | + | 39 | IRHA | - | 41 | BGLU | + |
| 43 | BMAN | - | 44 | PHC | - | 45 | PVATE | + | 46 | AGLU | (-) | 47 | dTAG | - | 48 | dTRE | + |
| 50 | INU | + | 53 | dGLU | + | 54 | dRIB | + | 56 | PSCNa | - | 58 | NaCl 6.5% | + | 59 | KAN | - |
| 60 | OLD | - | 61 | ESC | + | 62 | TTZ | + | 63 | POLYB_R | - | | | | | | |

VITEK 2 Systems Version: 03.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

Page 2 of 2

Şekil E4. 4 SDP1 izolatının VITEK 2 tanılama sonuç raporu

EK 5. Yağ asit metil Ester (FAME) Analiz Sonuç

| RT | Response | Ar/Ht | RFact | ECL | Peak Name | Percent | Comment1 | Comment2 |
|--------|----------|-------|-------|---------|------------------|---------|----------------------|----------------------|
| 0.7381 | 244370 | 0.005 | ---- | 6.6157 | | ---- | < min rt | |
| 0.7493 | 9.37E+8 | 0.020 | ---- | 6.6871 | SOLVENT PEAK | ---- | < min rt | |
| 1.0842 | 773 | 0.011 | ---- | 8.8355 | | ---- | < min rt | |
| 1.2057 | 811 | 0.012 | 1.225 | 9.6144 | 10:0 iso | 0.56 | ECL deviates -0.002 | Reference 0.006 |
| 1.2800 | 615 | 0.010 | ---- | 10.0703 | | ---- | | |
| 1.6502 | 647 | 0.012 | ---- | 11.7826 | | ---- | | |
| 1.7610 | 464 | 0.009 | ---- | 12.2160 | | ---- | | |
| 1.8733 | 372 | 0.009 | 1.043 | 12.6275 | 13:0 iso | 0.22 | ECL deviates 0.004 | Reference 0.006 |
| 2.1626 | 2353 | 0.009 | 1.001 | 13.6288 | 14:0 iso | 1.32 | ECL deviates 0.001 | Reference 0.000 |
| 2.2540 | 437 | 0.010 | ---- | 13.9349 | | ---- | | |
| 2.2736 | 628 | 0.010 | 0.988 | 14.0005 | 14:0 | 0.35 | ECL deviates 0.001 | Reference -0.001 |
| 2.3841 | 610 | 0.011 | ---- | 14.3520 | | ---- | | |
| 2.4716 | 31441 | 0.009 | 0.968 | 14.6305 | 15:0 iso | 17.09 | ECL deviates -0.002 | Reference -0.004 |
| 2.5010 | 69917 | 0.009 | 0.966 | 14.7239 | 15:0 anteiso | 37.89 | ECL deviates -0.001 | Reference -0.004 |
| 2.5871 | 766 | 0.009 | 0.958 | 14.9981 | 15:0 | ---- | ECL deviates -0.002 | |
| 2.7209 | 372 | 0.008 | 0.948 | 15.4147 | 16:1 w7c alcohol | 0.20 | ECL deviates 0.001 | |
| 2.7908 | 9355 | 0.009 | 0.943 | 15.6324 | 16:0 iso | 4.95 | ECL deviates -0.001 | Reference -0.005 |
| 2.8086 | 418 | 0.010 | ---- | 15.6877 | | ---- | | |
| 2.8393 | 855 | 0.010 | 0.939 | 15.7834 | 16:1 w11c | 0.45 | ECL deviates 0.001 | |
| 2.9085 | 5886 | 0.009 | 0.935 | 15.9988 | 16:0 | 3.09 | ECL deviates -0.001 | Reference -0.007 |
| 2.9328 | 362 | 0.010 | ---- | 16.0745 | | ---- | | |
| 2.9634 | 512 | 0.010 | 0.932 | 16.1697 | 15:0 iso 3OH | 0.27 | ECL deviates 0.008 | |
| 2.9940 | 646 | 0.011 | 0.930 | 16.2649 | 15:0 2OH | 0.34 | ECL deviates 0.010 | |
| 3.0429 | 3805 | 0.010 | 0.927 | 16.4168 | 17:1 iso w10c | 1.98 | ECL deviates 0.003 | |
| 3.0731 | 1955 | 0.011 | 0.925 | 16.5107 | Sum In Feature 4 | 1.01 | ECL deviates -0.001 | |
| 3.1131 | 24894 | 0.009 | 0.923 | 16.6350 | 17:0 iso | 12.90 | ECL deviates -0.002 | 17:1 anteiso B/iso I |
| 3.1448 | 30982 | 0.009 | 0.921 | 16.7338 | 17:0 anteiso | 16.02 | ECL deviates 0.001 | Reference -0.009 |
| 3.2305 | 380 | 0.009 | 0.917 | 17.0001 | 17:0 | 0.20 | ECL deviates 0.000 | Reference -0.006 |
| 3.5485 | 864 | 0.010 | 0.905 | 17.9983 | 18:0 | 0.44 | ECL deviates -0.002 | Reference -0.008 |
| 3.6129 | 448 | 0.010 | 0.903 | 18.2052 | 17:0 iso 3OH | 0.23 | ECL deviates 0.012 | Reference -0.012 |
| 3.7482 | 1009 | 0.012 | 0.899 | 18.6410 | 19:0 iso | 0.51 | ECL deviates 0.003 | Reference -0.008 |
| ---- | 1955 | ---- | ---- | ---- | Summed Feature 4 | 1.01 | 17:1 iso I/anteiso B | 17:1 anteiso B/iso I |

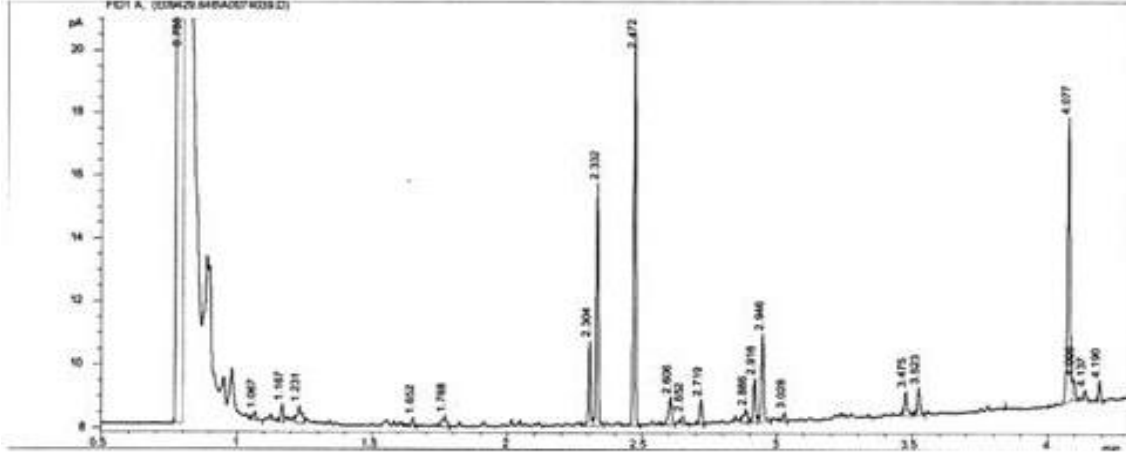
ECL Deviation: 0.004
Total Response: 191038
Percent Named: 98.14%

Reference ECL Shift: 0.007
Total Named: 187486
Total Amount: 178909

Number Reference Peaks: 13

Matches:

| Library | Sim Index | Entry Name |
|-------------|-----------|-------------------|
| RTSBA6 6.00 | 0.832 | Bacillus-subtilis |



Şekil E5. 1 SDP1 izolatının FAME analiz sonucu

EK 6. SDP1 16s rRNA analiz sonuçları

Bacillus subtilis strain SDP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: HM235916.1

FASTA Graphics

LOCUS HM235916 1510 bp DNA linear BCT 14-JUL-2010

DEFINITION Bacillus subtilis strain SDP1 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence.

ACCESSION HM235916

VERSION HM235916.1 GI:300390824

KEYWORDS .

SOURCE Bacillus subtilis

ORGANISM [Bacillus subtilis](#)

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1510)

AUTHORS Ozturk,H.U.

TITLE Bacillus subtilis from rhizosphere of Acacia cyanophylla Lindley.

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1510)

AUTHORS Ozturk,H.U., Denizci,A.A., Dincer,S. and Kazan,D.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (13-MAY-2010) Enzyme and Microbial Biotechnology,
TUBITAK, Marmara Research Centre Genetic and Biotechnology
Institute, Anibal Caddesi, Kocaeli 41470, Turkey

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1510

/organism="Bacillus subtilis"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="SDP1"

/isolation_source="rhizosphere soil of Acacia cyanophylla"

/db_xref="taxon:[1423](#)"

/country="Turkey: Balcali, Adana"

[rRNA](#) <1..>1510

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc
61 ggacagatgg gagcttgctc cctgatgta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa
121 cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat gcttgttga
181 accgcatggt tcaaacataa aaggtggctt cggctaccac ttacagatgg acccgcggcg
241 cattagctag ttggtgaggt aatggctcac caaggcaacg atgcgtagcc gacctgagag
301 ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg
361 gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaagtttt
421 cggatcgtaa agctctgtg ttagggaaga acaagtaccg ttcgaatagg gcggtacct
481 gacggtacct aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcg taatacgtag
541 gtggcaagcg ttgtccggaa ttattggcg taaagggctc gcagcggtt ccttaagtct
601 gatgtgaaag cccccggctc aaccggggag ggtcattgga aactgggaa cttgagtca
661 gaagaggaga gtggaattcc acgtgtagcg gtgaaatcg tagagatgt gaggaacacc
721 agtggcgaag gcgactctct ggtctgtaac tgacgctgag gagcgaagc gtggggagcg
781 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgtgaggggg
841 tttccgccc ttagtgtgc agtaacgca ttaagcactc cgctgggga gtacggtcg
901 aagactgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaagc ggtggagcat gtggttaat
961 tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct ctgacaatcc tagagatagg
1021 acgtcccctt cgggggcaga gtgacaggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga
1081 gatgtgggt taagtccgc aacgagcgca accctgac ttagttgcca gcattcagtt
1141 gggcacteta aggtgactgc cgtgacaaa ccggaggaag gtggggatga cgtaaatca
1201 tcatgccct tatgacctg gctacacacg tgctacaatg gacagaacaa agggcagcga
1261 aaccgcgagg ttaagccaat ccacaaatc tgttctcagt tcggatcgca gtctgcaact
1321 cgactgcgtg aagctggaat cgctagtaat cgcggatcag catgccgcg tgaatacgtt
1381 cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac cacgagagtt tgtaacacc gaagtcggtg
1441 aggtaacctt tatggagcca gccgccgaag gtgggacaga tgattgggt gatagtcgta
1501 accagtagc

//

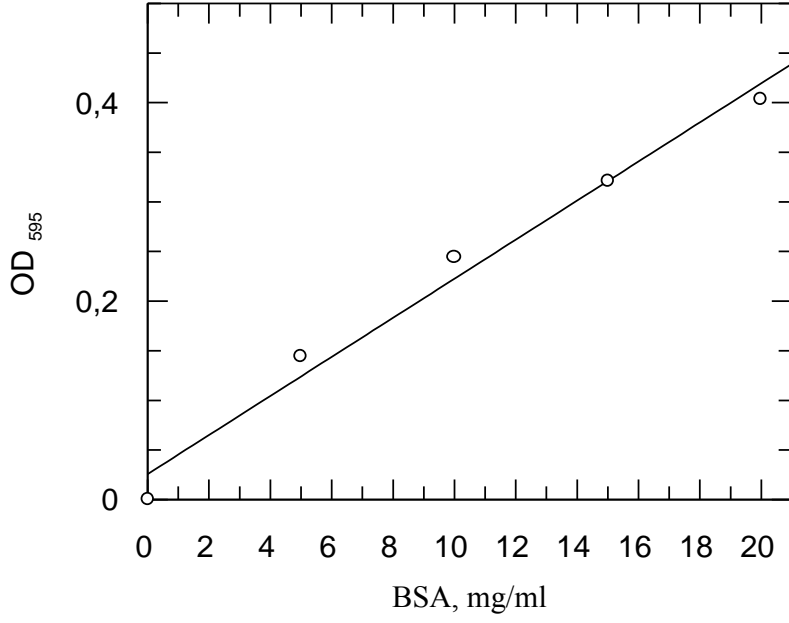
Sequences producing significant alignments:

(Click headers to sort columns)

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|---|----------------------|-------------|----------------|---------|-----------|-------|
| DQ993670.1 | Bacillus axarquiensis strain CIP 108772 16S ribosomal RNA gene, parti | 2758 | 2758 | 99% | 0.0 | 99% | |
| AM747812.1 | [Brevibacterium] halotolerans 16S rRNA gene, strain DSM 8802 | 2754 | 2754 | 99% | 0.0 | 99% | |
| FJ947049.1 | Bacillus subtilis strain BI1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2750 | 2750 | 99% | 0.0 | 99% | |
| EU723824.1 | Bacillus licheniformis strain HDDMM02 16S ribosomal RNA gene, partial | 2748 | 2748 | 100% | 0.0 | 99% | |
| DQ207730.2 | Bacillus subtilis strain CCM 1999 16S ribosomal RNA gene, complete se | 2748 | 2748 | 100% | 0.0 | 99% | |
| EU781655.1 | Bacillus sp. GMTB-C1-2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence | 2747 | 2747 | 99% | 0.0 | 99% | |
| EU308306.1 | Bacillus sp. FIA011_4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2745 | 2745 | 100% | 0.0 | 99% | |
| EU308304.1 | Bacillus sp. FIA011_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2745 | 2745 | 100% | 0.0 | 99% | |
| EU308303.1 | Bacillus sp. FIA011_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2745 | 2745 | 100% | 0.0 | 99% | |
| AB383135.1 | Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial sequence, country: Viet Na | 2745 | 2745 | 99% | 0.0 | 99% | |
| AB501343.1 | Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, complete sequence, strain: A33 | 2743 | 2743 | 100% | 0.0 | 99% | |
| AM913923.1 | Bacillus sp. LD153 partial 16S rRNA gene, isolate LD153 | 2743 | 2743 | 99% | 0.0 | 99% | |
| EU308305.1 | Bacillus sp. FIA011_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2743 | 2743 | 99% | 0.0 | 99% | |
| EU308281.1 | Bacillus sp. FIA02_1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence | 2743 | 2743 | 99% | 0.0 | 99% | |
| EU362148.1 | Bacillus sp. B2(2008) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2743 | 2743 | 99% | 0.0 | 99% | |
| EU047884.1 | Bacillus subtilis strain BS3902 16S ribosomal RNA gene, partial sequen | 2743 | 2743 | 100% | 0.0 | 99% | |
| FJ042890.1 | Bacillus sp. GMTB-4A 16S ribosomal RNA gene, complete sequence | 2739 | 2739 | 99% | 0.0 | 99% | |
| EU982437.1 | Uncultured bacterium clone DYA26 16S ribosomal RNA gene, partial se | 2739 | 2739 | 99% | 0.0 | 99% | |
| EU982422.1 | Uncultured bacterium clone DYA8 16S ribosomal RNA gene, partial seq | 2739 | 2739 | 99% | 0.0 | 99% | |
| EU982418.1 | Uncultured bacterium clone DYA4 16S ribosomal RNA gene, partial seq | 2739 | 2739 | 99% | 0.0 | 99% | |
| EU362172.1 | Bacillus sp. B26(2008) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2739 | 2739 | 99% | 0.0 | 99% | |
| EU257449.1 | Bacillus subtilis isolate C10-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc | 2739 | 2739 | 100% | 0.0 | 99% | |
| GQ903333.1 | Bacillus licheniformis strain dhs-55 16S ribosomal RNA gene, partial se | 2737 | 2737 | 100% | 0.0 | 99% | |
| EU308282.1 | Bacillus sp. FIA02_2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence | 2737 | 2737 | 99% | 0.0 | 99% | |
| FJ042891.1 | Bacillus sp. GMTB-4B 16S ribosomal RNA gene, complete sequence | 2737 | 2737 | 99% | 0.0 | 99% | |

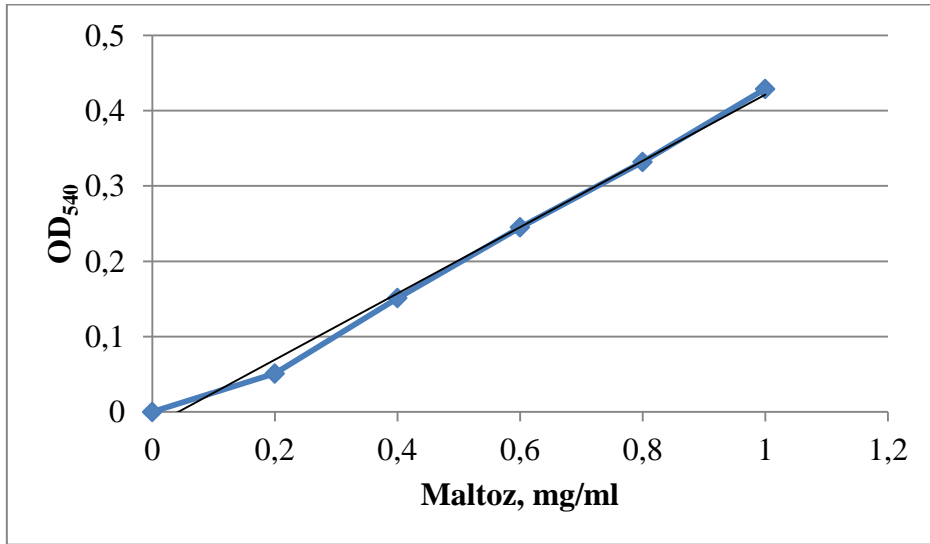
Şekil E6. 1 SDP1 izolatının 16s rRNAdatası ile yapılan BLAST analiz raporu

EK 7. Protein standart grafiği



Şekil E7. 1 Protein Standart Eğrisi Korelasyon katsayısı (r= 0.991)

EK 8. Maltoz standart grafiği



Şekil E8.1 Maltoz Standart grafiği Korelasyon katsayısı (r=0.9942)

EK 9. pKa sonuçları

PROPKA 3.1 results for 1UA7.pka

| RESIDUE | pKa | BURIED | DESOLVATION REGULAR | EFFECTS RE | SIDECHAIN HYDROGEN BOND | BACKBONE HYDROGEN BOND | COULOMBIC INTERACTION |
|---------------------------|-------|--------|------------------------|---------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| ASP 18 A | 1.90 | 15 % | 0.85 324 | 0.09 0 | -1.01 ARG 24 A | -0.19 ASP 18 A | -0.11 ARG 74 A |
| ASP 18 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | -0.82 GLN 20 A | -0.04 LYS 76 A |
| ASP 18 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.16 HIS 21 A |
| ASP 18 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.51 ARG 24 A |
| ASP 27 A | 2.89 | 0 % | 0.36 267 | 0.00 0 | -0.80 HIS 26 A | 0.00 XXX 0 X | -0.01 ARG 24 A |
| ASP 27 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.19 ARG 85 A |
| ASP 27 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.27 HIS 26 A |
| ASP 28 A | 4.46 | 61 % | 1.93 453 | 0.20 0 | -0.57 TYR 10 A | 0.00 XXX 0 X | -0.14 LYS 378 A |
| ASP 28 A | | | | | -0.85 TYR 367 A | 0.00 XXX 0 X | 0.04 ASP 27 A |
| ASP 28 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.04 ASP 382 A |
| ASP 34 A | 3.99 | 0 % | 0.18 254 | 0.00 0 | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.04 LYS 378 A |
| ASP 34 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.04 ASP 382 A |
| ASP 53 A | 4.51 | 78 % | 2.10 500 | 0.18 0 | 0.00 XXX 0 X | -0.71 GLY 55 A | -0.08 LYS 76 A |
| ASP 53 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | -0.00 TYR 56 A | 0.00 XXX 0 X |
| ASP 53 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | -0.78 GLY 57 A | 0.00 XXX 0 X |
| ASP 60 A | 3.29 | 100 % | 4.59 568 | 0.00 0 | -0.82 GLN 69 A | -0.67 TYR 62 A | -0.20 LYS 47 A |
| ASP 60 A | | | | | -1.33 ARG 146 A | 0.00 XXX 0 X | -0.11 LYS 154 A |
| ASP 60 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.76 LYS 106 A |
| ASP 60 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -1.21 ARG 146 A |
| ASP 63 A | 4.56 | 83 % | 3.57 513 | 1.18 0 | -0.80 GLN 69 A | -0.45 GLY 65 A | -0.17 ARG 146 A |
| ASP 63 A | | | | | -0.85 LYS 47 A | -0.84 GLU 66 A | -0.96 LYS 47 A |
| ASP 63 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | -0.68 PHE 67 A | 0.76 ASP 60 A |
| ASP 94 A | 3.99 | 0 % | 0.21 239 | 0.00 0 | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.03 N+ 1 A |
| ASP 100 A | 4.71* | 100 % | 4.74 713 | 0.85 0 | -0.80 TRP 41 A | -0.05 VAL 101 A | -2.03 ARG 229 A |
| ASP 100 A | | | | | -0.43 TYR 11 A | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X |
| ASP 100 A | | | | | -0.85 TYR 56 A | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X |
| ASP 100 A | | | | | -0.52 ARG 229 A | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X |
| ASP 110 A | 3.65 | 46 % | 1.69 409 | 0.35 0 | -0.85 TYR 59 A | -0.03 ASP 110 A | -0.38 LYS 70 A |
| ASP 110 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | -0.83 ASP 142 A | -0.04 LYS 106 A |
| ASP 110 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | -0.25 PHE 143 A | -0.04 LYS 154 A |
| ASP 110 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.05 ARG 156 A |
| ASP 110 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.09 ASP 60 A |
| ASP 110 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.20 ASP 142 A |
| ASP 128 A | 3.76 | 10 % | 0.59 309 | 0.08 0 | -0.24 ARG 176 A | 0.00 XXX 0 X | -0.47 ARG 176 A |
| ASP 136 A | 2.69 | 4 % | 0.66 292 | 0.01 0 | -1.40 ARG 168 A | 0.00 XXX 0 X | -0.38 ARG 168 A |
| ASP 142 A | 3.24 | 11 % | 0.70 313 | 0.00 0 | -0.63 ARG 156 A | 0.00 XXX 0 X | -0.18 LYS 154 A |
| ASP 142 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.44 ARG 156 A |
| ASP 152 A | 3.68 | 0 % | 0.20 253 | 0.00 0 | 0.00 XXX 0 X | -0.20 ASP 152 A | -0.02 ARG 146 A |
| ASP 152 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.10 LYS 154 A |
| ASP 164 A | 4.84 | 59 % | 1.44 446 | 0.29 0 | -0.53 TYR 195 A | -0.15 ASP 164 A | 0.00 XXX 0 X |
| ASP 166 A | 3.31 | 18 % | 1.54 332 | 0.12 0 | 0.00 XXX 0 X | -0.75 ASP 136 A | -0.11 ARG 168 A |
| ASP 166 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | -0.64 ARG 168 A | 0.16 ASP 136 A |
| ASP 166 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | -0.74 TYR 169 A | -0.07 HIS 173 A |
| ASP 187 A | 2.59 | 58 % | 2.14 445 | 0.10 0 | -0.73 TYR 262 A | -0.80 GLU 189 A | -0.01 ARG 185 A |
| ASP 187 A | | | | | -0.68 LYS 264 A | 0.00 XXX 0 X | -0.60 LYS 234 A |
| ASP 187 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.62 LYS 264 A |
| ASP 194 A | 3.67 | 100 % | 4.39 604 | 0.88 0 | -0.68 ASN 161 A | -0.85 ASN 183 A | -2.03 NA NA A |
| ASP 194 A | | | | | -0.83 ASN 183 A | 0.00 XXX 0 X | -0.16 ARG 125 A |
| ASP 194 A | | | | | -0.84 ASN 200 A | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X |
| ASP 202 A | 4.92* | 78 % | 2.44 501 | 0.49 0 | -0.85 SER 204 A | -0.73 SER 204 A | -0.07 NA NA A |
| ASP 202 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.46 ASP 194 A |
| ASP 202 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.62 HIS 205 A |
| ASP 210 A | 4.05 | 6 % | 0.40 297 | 0.04 0 | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.21 LYS 213 A |
| ASP 210 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.08 GLU 207 A |
| ASP 210 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.06 HIS 247 A |
| ASP 214 A | 4.73 | 26 % | 0.67 354 | 0.26 0 | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.06 LYS 213 A |
| ASP 214 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.17 ASP 210 A |
| ASP 214 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.19 HIS 247 A |
| ASP 214 A | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.07 GLU 251 A |
| ASP 221 A | 4.83 | 18 % | 0.61 333 | 0.22 0 | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.04 GLU 222 A |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|-------|-------|------|-----|------|---|-----------|-------|--|-----------|-------|-----------|-------|----------|-------|
| ASP 221 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.05 ASP | 224 A |
| ASP 221 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.06 GLU | 251 A |
| ASP 221 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.05 ASP | 253 A |
| ASP 224 A | 4.28 | 20 % | 0.54 | 336 | 0.27 | 0 | -0.09 LYS | 91 A | | 0.00 XXX | 0 X | 0.26 ASP | 226 A | | |
| ASP 224 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.51 LYS | 91 A | | |
| ASP 226 A | 3.75 | 50 % | 1.63 | 422 | 0.58 | 0 | -0.85 LYS | 91 A | | -0.80 VAL | 97 A | -0.61 LYS | 91 A | | |
| ASP 231 A | 8.51* | 100 % | 3.34 | 655 | 0.23 | 0 | -0.51 ARG | 229 A | | -0.04 ALA | 232 A | 1.08 ASP | 100 A | | |
| ASP 231 A | | | | | | | | | | 0.10 GLU | 261 A | -1.42 ARG | 229 A | | |
| ASP 231 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 1.35 GLU | 261 A | | |
| ASP 231 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.58 ASP | 328 A | | |
| ASP 243 A | 4.55 | 31 % | 0.85 | 368 | 0.31 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | | 0.00 XXX | 0 X | -0.30 LYS | 213 A | | |
| ASP 243 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.10 ARG | 246 A | | |
| ASP 243 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.01 HIS | 247 A | | |
| ASP 253 A | 3.92 | 0 % | 0.12 | 156 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | | |
| ASP 255 A | 3.94 | 0 % | 0.15 | 229 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | | 0.00 XXX | 0 X | -0.03 ARG | 249 A | | |
| ASP 255 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.02 ASP | 226 A | | |
| ASP 265 A | 3.74 | 43 % | 1.57 | 403 | 0.25 | 0 | -1.37 ARG | 294 A | | 0.00 XXX | 0 X | 0.07 ASP | 266 A | | |
| ASP 265 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.59 ARG | 294 A | | |
| ASP 266 A | 3.44 | 21 % | 0.66 | 341 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | | -0.12 GLY | 268 A | -0.23 LYS | 264 A | | |
| ASP 266 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.75 ALA | 269 A | | |
| ASP 266 A | | | | | | | | | | | | 0.07 ASP | 187 A | | |
| ASP 275 A | 3.53 | 0 % | 0.39 | 256 | 0.00 | 0 | -0.59 TRP | 279 A | | 0.00 XXX | 0 X | -0.08 HIS | 316 A | | |
| ASP 285 A | 6.18 | 100 % | 4.46 | 582 | 0.10 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | | -0.64 LEU | 288 A | 0.02 ASP | 265 A | | |
| ASP 285 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.84 LEU | 312 A | | |
| ASP 285 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.79 VAL | 313 A | | |
| ASP 285 A | | | | | | | | | | | | 0.07 GLU | 314 A | | |
| ASP 303 A | 1.64 | 2 % | 0.77 | 287 | 0.00 | 0 | -1.50 ARG | 305 A | | -0.74 ARG | 305 A | -0.17 NA | NA A | | |
| ASP 303 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.08 ARG | 309 A | | |
| ASP 303 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.06 HIS | 402 A | | |
| ASP 303 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.38 ARG | 305 A | | |
| ASP 325 A | 5.31* | 100 % | 4.83 | 618 | 2.12 | 0 | -0.85 THR | 329 A | | -0.83 VAL | 339 A | -2.03 NA | NA A | | |
| ASP 325 A | | | | | | | | | | -0.84 LYS | 344 A | -0.01 LYS | 377 A | | |
| ASP 325 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.03 GLU | 336 A | | |
| ASP 325 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -2.03 LYS | 344 A | | |
| ASP 325 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 1.12 ASP | 365 A | | |
| ASP 328 A | 7.54* | 100 % | 2.96 | 586 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | | 0.00 XXX | 0 X | 0.19 ASP | 100 A | | |
| ASP 328 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.14 GLU | 333 A | | |
| ASP 328 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.73 ARG | 229 A | | |
| ASP 328 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 1.18 GLU | 261 A | | |
| ASP 341 A | 3.24 | 30 % | 0.82 | 364 | 0.03 | 0 | -0.58 LYS | 377 A | | -0.00 ASP | 341 A | -0.28 LYS | 344 A | | |
| ASP 341 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.55 LYS | 377 A | | |
| ASP 365 A | 3.95* | 100 % | 4.27 | 640 | 0.35 | 0 | -0.85 LYS | 344 A | | 0.00 XXX | 0 X | -0.38 NA | NA A | | |
| ASP 365 A | | | | | | | | | | -0.85 TYR | 348 A | 0.14 ASP | 341 A | | |
| ASP 365 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -2.03 LYS | 344 A | | |
| ASP 365 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.50 LYS | 377 A | | |
| ASP 372 A | 3.34 | 6 % | 0.60 | 299 | 0.04 | 0 | -0.83 ASN | 371 A | | 0.00 XXX | 0 X | -0.26 HIS | 14 A | | |
| ASP 379 A | 3.99 | 0 % | 0.19 | 230 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | | 0.00 XXX | 0 X | -0.10 LYS | 378 A | | |
| ASP 379 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.10 ASP | 382 A | | |
| ASP 382 A | 3.81 | 46 % | 1.77 | 411 | 0.44 | 0 | -0.85 TYR | 366 A | | 0.00 XXX | 0 X | -0.51 LYS | 378 A | | |
| ASP 382 A | | | | | | | | | | -0.84 LYS | 378 A | 0.00 XXX | 0 X | | |
| ASP 386 A | 4.60 | 51 % | 1.23 | 425 | 0.24 | 0 | -0.71 ASN | 390 A | | 0.00 XXX | 0 X | 0.02 ASP | 34 A | | |
| ASP 386 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.02 ASP | 382 A | | |
| ASP 398 A | 2.82 | 56 % | 1.88 | 438 | 0.04 | 0 | -0.25 GLN | 396 A | | 0.00 XXX | 0 X | -0.04 ARG | 410 A | | |
| ASP 398 A | | | | | | | | | | -1.56 ARG | 354 A | 0.00 XXX | 0 X | | |
| ASP 398 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.07 HIS | 397 A | | |
| ASP 398 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.97 ARG | 354 A | | |
| ASP 401 A | 3.13 | 28 % | 1.03 | 360 | 0.07 | 0 | -0.85 LYS | 433 A | | -0.21 ASP | 401 A | -0.03 ARG | 305 A | | |
| ASP 401 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.10 HIS | 402 A | | |
| ASP 401 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.57 LYS | 433 A | | |
| ASP 404 A | 3.31 | 11 % | 0.93 | 311 | 0.08 | 0 | -0.85 GOL | O2 A | | 0.00 XXX | 0 X | -0.46 NA | NA A | | |
| ASP 404 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.02 ARG | 305 A | | |
| ASP 404 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.06 ASP | 303 A | | |
| ASP 404 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.23 HIS | 402 A | | |
| ASP 448 A | 4.18 | 70 % | 3.11 | 477 | 0.87 | 0 | -0.80 THR | 450 A | | -0.76 THR | 450 A | 0.00 XXX | 0 X | | |
| ASP 448 A | | | | | | | | | | -0.74 SER | 475 A | -0.01 GLY | 451 A | | |
| ASP 448 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.20 ASN | 452 A | | |
| ASP 448 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.29 ASN | 453 A | | |
| ASP 448 A | | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | -0.80 VAL | 476 A | | |
| ASP 462 A | 3.90 | 0 % | 0.18 | 163 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | | 0.00 XXX | 0 X | -0.09 ARG | 439 A | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|-------|-------|------|-----|------|---|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|
| GLU 12 A | 5.56 | 72 % | 2.86 | 482 | 0.21 | 0 | -0.85 | GLN 330 A | -0.73 | HIS 14 A | -0.24 | LYS 76 A |
| GLU 12 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.34 | HIS 14 A |
| GLU 12 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.03 | GLU 16 A |
| GLU 12 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.12 | ASP 372 A |
| GLU 16 A | 4.66 | 0 % | 0.15 | 231 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.03 | ARG 24 A |
| GLU 16 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.06 | LYS 76 A |
| GLU 16 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.01 | HIS 14 A |
| GLU 16 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.11 | ASP 18 A |
| GLU 66 A | 4.91 | 26 % | 1.23 | 355 | 0.01 | 0 | -0.78 | TYR 150 A | 0.00 | XXX 0 X | -0.01 | LYS 47 A |
| GLU 66 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.46 | LYS 80 A |
| GLU 66 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.02 | ARG 146 A |
| GLU 66 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.16 | ASP 63 A |
| GLU 66 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.14 | GLU 84 A |
| GLU 66 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.15 | GLU 222 A |
| GLU 84 A | 4.52 | 27 % | 0.81 | 356 | 0.20 | 0 | -0.73 | LYS 80 A | 0.00 | XXX 0 X | 0.25 | GLU 222 A |
| GLU 84 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.51 | LYS 80 A |
| GLU 113 A | 4.64 | 37 % | 1.76 | 384 | 0.07 | 0 | -0.77 | THR 139 A | -0.71 | TRP 157 A | -0.26 | ARG 156 A |
| GLU 113 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.05 | ASP 142 A |
| GLU 171 A | 4.22 | 0 % | 0.34 | 236 | 0.00 | 0 | -0.49 | HIS 173 A | 0.00 | XXX 0 X | 0.14 | ASP 166 A |
| GLU 171 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.27 | HIS 173 A |
| GLU 188 A | 4.61 | 6 % | 0.38 | 297 | 0.02 | 0 | -0.00 | ARG 185 A | 0.00 | XXX 0 X | -0.31 | ARG 185 A |
| GLU 188 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.07 | LYS 264 A |
| GLU 188 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.10 | ASP 187 A |
| GLU 189 A | 4.53 | 19 % | 0.48 | 335 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.04 | ARG 125 A |
| GLU 189 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.41 | LYS 234 A |
| GLU 189 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.24 | LYS 264 A |
| GLU 189 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.24 | ASP 187 A |
| GLU 207 A | 3.77 | 0 % | 0.40 | 255 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX 0 X | -0.80 | GLU 207 A | -0.12 | HIS 159 A |
| GLU 207 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.20 | HIS 205 A |
| GLU 211 A | 6.97 | 82 % | 2.55 | 511 | 0.62 | 0 | -0.70 | TYR 62 A | 0.00 | XXX 0 X | -0.25 | LYS 106 A |
| GLU 211 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.14 | ARG 146 A |
| GLU 211 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.06 | ASP 60 A |
| GLU 211 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.07 | ASP 152 A |
| GLU 211 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.02 | ASP 210 A |
| GLU 211 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.24 | ASP 214 A |
| GLU 222 A | 4.00 | 25 % | 0.82 | 352 | 0.04 | 0 | -0.85 | LYS 80 A | 0.00 | XXX 0 X | -0.51 | LYS 80 A |
| GLU 251 A | 4.47 | 0 % | 0.27 | 251 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.00 | LYS 213 A |
| GLU 251 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.31 | HIS 247 A |
| GLU 251 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.01 | ASP 253 A |
| GLU 261 A | 5.52* | 100 % | 2.80 | 662 | 0.68 | 0 | -0.10 | ASP 231 A | -0.78 | ALA 232 A | -0.31 | LYS 234 A |
| GLU 261 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.37 | ASP 100 A |
| GLU 261 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -1.64 | ARG 229 A |
| GLU 271 A | 4.98 | 14 % | 0.63 | 320 | 0.08 | 0 | -0.13 | HIS 316 A | 0.00 | XXX 0 X | 0.06 | ASP 266 A |
| GLU 271 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.08 | ASP 275 A |
| GLU 271 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.03 | GLU 314 A |
| GLU 271 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.28 | HIS 316 A |
| GLU 276 A | 4.86 | 5 % | 0.39 | 295 | 0.01 | 0 | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.12 | ARG 185 A |
| GLU 276 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.08 | ASP 275 A |
| GLU 280 A | 2.45 | 13 % | 0.78 | 319 | 0.13 | 0 | -0.83 | ASN 278 A | 0.00 | XXX 0 X | -0.17 | ARG 249 A |
| GLU 280 A | | | | | | | -1.56 | ARG 246 A | 0.00 | XXX 0 X | -0.40 | ARG 246 A |
| GLU 314 A | 4.87 | 26 % | 0.83 | 354 | 0.27 | 0 | 0.00 | XXX 0 X | -0.66 | GLY 310 A | -0.07 | ARG 309 A |
| GLU 333 A | 5.74 | 28 % | 1.21 | 359 | 0.20 | 0 | -0.03 | HIS 14 A | 0.00 | XXX 0 X | -0.02 | LYS 76 A |
| GLU 333 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.05 | GLU 12 A |
| GLU 333 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.30 | HIS 14 A |
| GLU 333 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.04 | GLU 336 A |
| GLU 333 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.08 | ASP 372 A |
| GLU 336 A | 4.24 | 6 % | 0.43 | 298 | 0.04 | 0 | 0.00 | XXX 0 X | -0.78 | GLY 332 A | -0.01 | NA NA A |
| GLU 336 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.05 | ASP 372 A |
| GLU 355 A | 4.88 | 30 % | 0.68 | 365 | 0.10 | 0 | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.16 | ARG 354 A |
| GLU 355 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.36 | ARG 410 A |
| GLU 355 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | -0.04 | HIS 397 A |
| GLU 355 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.16 | ASP 398 A |
| GLU 383 A | 6.53 | 34 % | 0.91 | 376 | 0.76 | 0 | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.13 | ASP 379 A |
| GLU 383 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.07 | ASP 382 A |
| GLU 383 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.04 | ASP 386 A |
| GLU 383 A | | | | | | | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X | 0.13 | ASP 448 A |
| GLU 411 A | 3.61 | 21 % | 0.87 | 341 | 0.07 | 0 | -0.65 | GLN 440 A | 0.00 | XXX 0 X | -0.34 | HIS 397 A |
| GLU 411 A | | | | | | | -0.85 | HIS 397 A | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X |
| GLU 466 A | 4.47 | 0 % | 0.48 | 281 | 0.00 | 0 | -0.51 | SER 432 A | 0.00 | XXX 0 X | 0.00 | XXX 0 X |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-----|------|---|-------|-----|-------|-------|-----|-------|-------|-----|-------|
| C- 480 A | 3.44 | 0 % | 0.24 | 260 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X |
| HIS 14 A | 6.40 | 23 % | -0.89 | 346 | 0.00 | 0 | 0.03 | GLU | 333 A | 0.00 | XXX | 0 X | -0.14 | LYS | 76 A |
| HIS 14 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.34 | GLU | 12 A |
| HIS 14 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.01 | GLU | 16 A |
| HIS 14 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.30 | GLU | 333 A |
| HIS 14 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.26 | ASP | 372 A |
| HIS 21 A | 3.10 | 100 % | -3.53 | 580 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX | 0 X | 0.83 | TYR | 10 A | -0.69 | ARG | 24 A |
| HIS 21 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -0.17 | LYS | 76 A |
| HIS 21 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.16 | ASP | 18 A |
| HIS 26 A | 6.68 | 0 % | -0.50 | 277 | 0.00 | 0 | 0.80 | ASP | 27 A | 0.00 | XXX | 0 X | -0.38 | ARG | 85 A |
| HIS 26 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.27 | ASP | 27 A |
| HIS 105 A | 4.03 | 100 % | -2.78 | 610 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX | 0 X | 0.78 | TYR | 56 A | -0.39 | NA | NA A |
| HIS 105 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -0.08 | LYS | 106 A |
| HIS 159 A | 4.08 | 65 % | -2.23 | 462 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -0.01 | LYS | 106 A |
| HIS 159 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -0.08 | ARG | 156 A |
| HIS 159 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -0.21 | HIS | 205 A |
| HIS 159 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.12 | GLU | 207 A |
| HIS 173 A | 6.50 | 17 % | -0.83 | 329 | 0.00 | 0 | 0.49 | GLU | 171 A | 0.00 | XXX | 0 X | 0.07 | ASP | 166 A |
| HIS 173 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.27 | GLU | 171 A |
| HIS 205 A | 6.16* | 42 % | -1.16 | 400 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | PHE | 158 A | 0.20 | GLU | 207 A |
| HIS 205 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.62 | ASP | 202 A |
| HIS 235 A | 1.71 | 100 % | -3.34 | 588 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX | 0 X | 0.82 | TYR | 193 A | -0.84 | NA | NA A |
| HIS 235 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -0.24 | ARG | 125 A |
| HIS 235 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -1.00 | LYS | 234 A |
| HIS 235 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -0.19 | HIS | 105 A |
| HIS 247 A | 5.88 | 25 % | -0.95 | 352 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -0.23 | LYS | 213 A |
| HIS 247 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.06 | ASP | 210 A |
| HIS 247 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.19 | ASP | 214 A |
| HIS 247 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.01 | ASP | 243 A |
| HIS 247 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.31 | GLU | 251 A |
| HIS 316 A | 6.18 | 14 % | -0.81 | 320 | 0.00 | 0 | 0.13 | GLU | 271 A | 0.00 | XXX | 0 X | 0.28 | GLU | 271 A |
| HIS 316 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.08 | ASP | 275 A |
| HIS 319 A | 5.98 | 27 % | -0.98 | 356 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX | 0 X | 0.60 | MET | 281 A | -0.14 | HIS | 316 A |
| HIS 327 A | 1.85 | 100 % | -3.56 | 633 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -1.09 | ARG | 229 A |
| HIS 397 A | 6.85 | 25 % | -0.94 | 350 | 0.00 | 0 | 0.85 | GLU | 411 A | 0.00 | XXX | 0 X | 0.04 | GLU | 355 A |
| HIS 397 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.07 | ASP | 398 A |
| HIS 397 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.34 | GLU | 411 A |
| HIS 402 A | 5.75 | 7 % | -0.73 | 300 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -0.11 | NA | NA A |
| HIS 402 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -0.10 | ARG | 305 A |
| HIS 402 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | -0.22 | LYS | 433 A |
| HIS 402 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.06 | ASP | 303 A |
| HIS 402 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.10 | ASP | 401 A |
| HIS 402 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.23 | ASP | 404 A |
| TYR 10 A | 16.30 | 90 % | 3.19 | 533 | 0.00 | 0 | 0.57 | ASP | 28 A | 0.00 | XXX | 0 X | -0.22 | ARG | 24 A |
| TYR 10 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.06 | ASP | 27 A |
| TYR 10 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.84 | TYR | 363 A |
| TYR 10 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.05 | TYR | 366 A |
| TYR 10 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.81 | TYR | 367 A |
| TYR 10 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 1.00 | ASP | 28 A |
| TYR 11 A | 16.92 | 100 % | 4.97 | 678 | 0.00 | 0 | -0.13 | TRP | 41 A | 0.00 | XXX | 0 X | -1.27 | ARG | 229 A |
| TYR 11 A | | | | | | | -0.85 | TYR | 56 A | 0.00 | XXX | 0 X | 0.34 | ASP | 231 A |
| TYR 11 A | | | | | | | 0.43 | ASP | 100 A | 0.00 | XXX | 0 X | 0.17 | GLU | 261 A |
| TYR 11 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.47 | ASP | 328 A |
| TYR 11 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.15 | TYR | 46 A |
| TYR 11 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.78 | TYR | 77 A |
| TYR 11 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 1.86 | ASP | 100 A |
| TYR 46 A | 15.08 | 100 % | 4.39 | 722 | 0.00 | 0 | 0.00 | XXX | 0 X | -0.61 | VAL | 102 A | -0.17 | ARG | 229 A |
| TYR 46 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.44 | ASP | 231 A |
| TYR 46 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 1.04 | ASP | 100 A |
| TYR 56 A | 21.78 | 100 % | 4.60 | 681 | 0.00 | 0 | -0.00 | ARG | 229 A | 0.00 | XXX | 0 X | 0.01 | ASP | 53 A |
| TYR 56 A | | | | | | | 0.85 | TYR | 11 A | 0.00 | XXX | 0 X | -2.03 | ARG | 229 A |
| TYR 56 A | | | | | | | 0.85 | ASP | 100 A | 0.00 | XXX | 0 X | 2.03 | TYR | 11 A |
| TYR 56 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.40 | TYR | 46 A |
| TYR 56 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.55 | TYR | 77 A |
| TYR 56 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 2.03 | ASP | 100 A |
| TYR 56 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 1.10 | ASP | 231 A |
| TYR 56 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.53 | GLU | 261 A |
| TYR 56 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.85 | ASP | 328 A |
| TYR 59 A | 14.53 | 65 % | 2.80 | 464 | 0.00 | 0 | 0.85 | ASP | 110 A | -0.37 | PHE | 143 A | 0.48 | ASP | 60 A |
| TYR 59 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.09 | ASP | 63 A |
| TYR 59 A | | | | | | | 0.00 | XXX | 0 X | 0.00 | XXX | 0 X | 0.13 | ASP | 142 A |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|-------|-------|------|-----|------|---|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| TYR 59 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.14 ARG | 146 A |
| TYR 59 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.01 ARG | 156 A |
| TYR 59 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.70 ASP | 110 A |
| TYR 62 A | 14.23 | 76 % | 2.82 | 493 | 0.00 | 0 | -0.52 SER | 151 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.17 ASP | 60 A | | |
| TYR 62 A | | | | | | | | | 0.70 GLU | 211 A | 0.00 XXX | 0 X | -0.25 ARG | 146 A |
| TYR 62 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.03 ASP | 152 A |
| TYR 62 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.20 ASP | 214 A |
| TYR 62 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 1.07 GLU | 211 A |
| TYR 77 A | 14.45 | 100 % | 3.92 | 613 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.06 GLU | 12 A | | |
| TYR 77 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.30 ASP | 53 A |
| TYR 77 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.18 ASP | 100 A |
| TYR 98 A | 15.38 | 85 % | 2.97 | 520 | 0.00 | 0 | 0.85 TYR | 358 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.20 ASP | 226 A | | |
| TYR 98 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 1.35 TYR | 358 A |
| TYR 133 A | 10.92 | 16 % | 1.19 | 327 | 0.00 | 0 | -0.82 GLN | 119 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.26 ASP | 166 A | | |
| TYR 133 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.23 GLU | 171 A |
| TYR 133 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.08 TYR | 169 A |
| TYR 150 A | 12.19 | 26 % | 1.07 | 355 | 0.00 | 0 | -0.11 LYS | 80 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.04 ASP | 63 A | | |
| TYR 150 A | | | | | | | | | 0.78 GLU | 66 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.13 GLU | 84 A |
| TYR 150 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.04 ARG | 146 A |
| TYR 150 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.35 GLU | 222 A |
| TYR 150 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.51 LYS | 80 A |
| TYR 150 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.49 GLU | 66 A |
| TYR 169 A | 10.27 | 0 % | 0.23 | 200 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.05 ASP | 136 A | | |
| TYR 169 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.12 ASP | 166 A |
| TYR 169 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.17 ARG | 168 A |
| TYR 169 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.04 GLU | 171 A |
| TYR 193 A | 11.15 | 54 % | 1.07 | 433 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.32 ARG | 125 A | | |
| TYR 193 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.11 ASP | 187 A |
| TYR 193 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.30 GLU | 189 A |
| TYR 193 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.02 LYS | 264 A |
| TYR 195 A | 15.64 | 98 % | 4.33 | 556 | 0.00 | 0 | 0.53 ASP | 164 A | -0.04 ASP | 164 A | -0.12 NA | NA A | | |
| TYR 195 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.13 ARG | 125 A |
| TYR 195 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 1.06 ASP | 164 A |
| TYR 228 A | 12.85 | 87 % | 3.67 | 526 | 0.00 | 0 | -0.85 THR | 220 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.12 ASP | 221 A | | |
| TYR 228 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.09 ARG | 249 A |
| TYR 240 A | 14.54 | 93 % | 4.10 | 543 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.13 ASP | 210 A | | |
| TYR 240 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.10 GLU | 211 A |
| TYR 240 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.09 ASP | 214 A |
| TYR 240 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.13 ASP | 243 A |
| TYR 262 A | 14.76 | 75 % | 2.82 | 491 | 0.00 | 0 | 0.73 ASP | 187 A | 0.00 XXX | 0 X | -0.07 ARG | 185 A | | |
| TYR 262 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.06 GLU | 188 A |
| TYR 262 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.02 GLU | 189 A |
| TYR 262 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.08 ASP | 266 A |
| TYR 262 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.27 TYR | 273 A |
| TYR 262 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.84 ASP | 187 A |
| TYR 273 A | 13.18 | 100 % | 3.98 | 633 | 0.00 | 0 | -0.80 THR | 241 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | | |
| TYR 290 A | 10.88 | 61 % | 1.84 | 451 | 0.00 | 0 | -0.74 TRP | 263 A | 0.00 XXX | 0 X | -0.25 NA | NA A | | |
| TYR 290 A | | | | | | | | | -0.27 SER | 337 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.01 GLU | 189 A |
| TYR 290 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.02 GLU | 261 A |
| TYR 290 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.21 ASP | 265 A |
| TYR 290 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.06 ARG | 294 A |
| TYR 290 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.01 ASP | 325 A |
| TYR 290 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.05 ASP | 328 A |
| TYR 290 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.07 TYR | 293 A |
| TYR 293 A | 10.69 | 15 % | 0.55 | 322 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.11 NA | NA A | | |
| TYR 293 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.05 ASP | 325 A |
| TYR 293 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.20 GLU | 336 A |
| TYR 302 A | 11.84 | 65 % | 2.13 | 462 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.03 NA | NA A | | |
| TYR 302 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.02 ASP | 265 A |
| TYR 302 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.25 ARG | 294 A |
| TYR 302 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.07 ASP | 303 A |
| TYR 302 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.09 ARG | 309 A |
| TYR 348 A | 16.52 | 100 % | 4.12 | 688 | 0.00 | 0 | 0.85 ASP | 365 A | -0.81 PHE | 362 A | -0.22 NA | NA A | | |
| TYR 348 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.54 ASP | 325 A | | |
| TYR 348 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 2.03 ASP | 365 A |
| TYR 358 A | 12.07 | 91 % | 3.03 | 535 | 0.00 | 0 | -0.85 TYR | 98 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.03 ASP | 226 A | | |
| TYR 358 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.14 ARG | 388 A |
| TYR 363 A | 12.14 | 80 % | 2.30 | 506 | 0.00 | 0 | -0.13 ARG | 24 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.19 GLU | 12 A | | |
| TYR 363 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.08 ASP | 18 A |
| TYR 363 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.47 ARG | 24 A |
| TYR 363 A | | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.18 ASP | 28 A |
| TYR 366 A | 14.01 | 60 % | 2.17 | 450 | 0.00 | 0 | 0.85 ASP | 382 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.25 ASP | 28 A | | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-----|------|---|-----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|-------|
| TYR 366 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.03 ASP | 34 A |
| TYR 366 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.03 ASP | 379 A |
| TYR 366 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.68 ASP | 382 A |
| TYR 367 A | 14.61 | 62 % | 2.08 | 455 | 0.00 | 0 | 0.85 ASP | 28 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.13 ASP | 382 A | |
| TYR 367 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.31 TYR | 363 A |
| TYR 367 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.46 TYR | 366 A |
| TYR 367 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.77 ASP | 28 A |
| TYR 391 A | 11.42 | 32 % | 0.85 | 371 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.39 ASP | 386 A | |
| TYR 391 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.18 C- | 480 A |
| TYR 393 A | 10.80 | 43 % | 2.30 | 403 | 0.00 | 0 | -0.02 ASN | 4 A | -0.81 ASN | 4 A | -0.21 ARG | 388 A | |
| TYR 393 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.07 ARG | 410 A |
| TYR 393 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.39 ARG | 416 A |
| TYR 399 A | 11.05 | 40 % | 1.71 | 392 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | -0.84 TYR | 436 A | 0.03 ASP | 398 A | |
| TYR 399 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.08 ASP | 401 A |
| TYR 399 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.02 GLU | 411 A |
| TYR 399 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.04 TYR | 436 A |
| TYR 436 A | 9.95 | 0 % | 0.45 | 271 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | -0.77 ARG | 439 A | 0.30 GLU | 411 A | |
| TYR 436 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.06 ARG | 439 A |
| TYR 436 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.03 ASP | 462 A |
| TYR 477 A | 12.23 | 54 % | 2.42 | 433 | 0.00 | 0 | -0.22 SER | 475 A | -0.39 PHE | 468 A | 0.41 ASP | 448 A | |
| TYR 477 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 GLU | 466 A |
| LYS 47 A | 9.41 | 65 % | -3.09 | 463 | 0.00 | 0 | 0.85 ASP | 63 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.20 ASP | 60 A | |
| LYS 47 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.01 GLU | 66 A |
| LYS 47 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.01 ARG | 74 A |
| LYS 47 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.02 LYS | 70 A |
| LYS 47 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.96 ASP | 63 A |
| LYS 70 A | 9.55 | 45 % | -1.33 | 408 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.38 ASP | 110 A | |
| LYS 76 A | 8.65 | 71 % | -2.26 | 479 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.24 GLU | 12 A | |
| LYS 76 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.06 GLU | 16 A |
| LYS 76 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.04 ASP | 18 A |
| LYS 76 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.02 ARG | 24 A |
| LYS 76 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.08 ASP | 53 A |
| LYS 76 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.01 ARG | 74 A |
| LYS 76 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.02 GLU | 333 A |
| LYS 80 A | 12.90 | 35 % | -1.28 | 378 | 0.00 | 0 | 0.11 TYR | 150 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.46 GLU | 66 A | |
| LYS 80 A | | | | | | | | 0.73 GLU | 84 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.51 TYR | 150 A |
| LYS 80 A | | | | | | | | 0.85 GLU | 222 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.51 GLU | 84 A |
| LYS 80 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.51 GLU | 222 A |
| LYS 91 A | 10.90 | 41 % | -1.66 | 396 | 0.00 | 0 | 0.09 ASP | 224 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.51 ASP | 224 A | |
| LYS 91 A | | | | | | | | 0.85 ASP | 226 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.61 ASP | 226 A |
| LYS 106 A | 7.69 | 100 % | -3.60 | 683 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.04 ASP | 110 A | |
| LYS 106 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.27 ARG | 146 A |
| LYS 106 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.25 GLU | 211 A |
| LYS 106 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.76 ASP | 60 A |
| LYS 154 A | 9.64 | 17 % | -0.96 | 330 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.11 ASP | 60 A | |
| LYS 154 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.04 ASP | 110 A |
| LYS 154 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.18 ASP | 142 A |
| LYS 154 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.25 ARG | 146 A |
| LYS 154 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.10 ASP | 152 A |
| LYS 154 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.09 ARG | 156 A |
| LYS 213 A | 10.39 | 19 % | -0.68 | 335 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.21 ASP | 210 A | |
| LYS 213 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.06 ASP | 214 A |
| LYS 213 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.30 ASP | 243 A |
| LYS 213 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 GLU | 251 A |
| LYS 234 A | 9.16 | 79 % | -2.36 | 502 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.01 ARG | 125 A | |
| LYS 234 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.41 GLU | 189 A |
| LYS 234 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.31 GLU | 261 A |
| LYS 234 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.29 LYS | 264 A |
| LYS 234 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.60 ASP | 187 A |
| LYS 264 A | 11.34 | 36 % | -1.03 | 382 | 0.00 | 0 | 0.68 ASP | 187 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.07 GLU | 188 A | |
| LYS 264 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.24 GLU | 189 A |
| LYS 264 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.23 ASP | 266 A |
| LYS 264 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.02 TYR | 193 A |
| LYS 264 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.62 ASP | 187 A |
| LYS 344 A | 10.85 | 100 % | -4.87 | 599 | 0.00 | 0 | 0.84 ASP | 325 A | 0.00 XXX | 0 X | -0.81 NA | NA A | |
| LYS 344 A | | | | | | | | 0.85 ASP | 365 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.28 ASP | 341 A |
| LYS 344 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 2.03 ASP | 325 A |
| LYS 344 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 2.03 ASP | 365 A |
| LYS 377 A | 10.00 | 46 % | -1.69 | 409 | 0.00 | 0 | 0.58 ASP | 341 A | 0.00 XXX | 0 X | 0.01 ASP | 325 A | |
| LYS 377 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | -0.45 LYS | 344 A |
| LYS 377 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.55 ASP | 341 A |
| LYS 377 A | | | | | | | | 0.00 XXX | 0 X | 0.00 XXX | 0 X | 0.50 ASP | 365 A |

| | | | | | | | | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-----|------|---|----------------|--------------|-----------------|
| LYS 378 A | 11.51 | 15 % | -0.61 | 323 | 0.00 | 0 | 0.84 ASP 382 A | 0.00 XXX 0 X | 0.14 ASP 28 A |
| LYS 378 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.04 ASP 34 A |
| LYS 378 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.10 ASP 379 A |
| LYS 378 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.51 ASP 382 A |
| LYS 433 A | 9.93 | 53 % | -1.99 | 431 | 0.00 | 0 | 0.85 ASP 401 A | 0.00 XXX 0 X | -0.00 ARG 305 A |
| LYS 433 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.57 ASP 401 A |
| ARG 24 A | 13.50 | 45 % | -1.37 | 408 | 0.00 | 0 | 0.13 TYR 363 A | 0.00 XXX 0 X | 0.22 TYR 10 A |
| ARG 24 A | | | | | | | 1.01 ASP 18 A | 0.00 XXX 0 X | 0.03 GLU 16 A |
| ARG 24 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.01 ASP 27 A |
| ARG 24 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.47 TYR 363 A |
| ARG 24 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.51 ASP 18 A |
| ARG 74 A | 11.66 | 18 % | -0.95 | 332 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.11 ASP 18 A |
| ARG 85 A | 12.32 | 0 % | -0.37 | 226 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.19 ASP 27 A |
| ARG 125 A | 10.82 | 67 % | -2.17 | 469 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.15 NA NA A |
| ARG 125 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.04 GLU 189 A |
| ARG 125 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.32 TYR 193 A |
| ARG 125 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.16 ASP 194 A |
| ARG 125 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.13 TYR 195 A |
| ARG 146 A | 13.21 | 65 % | -2.62 | 464 | 0.00 | 0 | 1.33 ASP 60 A | 0.00 XXX 0 X | 0.14 TYR 59 A |
| ARG 146 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.25 TYR 62 A |
| ARG 146 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.17 ASP 63 A |
| ARG 146 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.02 GLU 66 A |
| ARG 146 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.04 TYR 150 A |
| ARG 146 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.02 ASP 152 A |
| ARG 146 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.14 GLU 211 A |
| ARG 146 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 1.21 ASP 60 A |
| ARG 156 A | 13.00 | 21 % | -0.90 | 340 | 0.00 | 0 | 0.63 ASP 142 A | 0.00 XXX 0 X | 0.01 TYR 59 A |
| ARG 156 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.05 ASP 110 A |
| ARG 156 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.26 GLU 113 A |
| ARG 156 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.44 ASP 142 A |
| ARG 168 A | 14.15 | 0 % | -0.41 | 249 | 0.00 | 0 | 1.40 ASP 136 A | 0.00 XXX 0 X | 0.11 ASP 166 A |
| ARG 168 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.17 TYR 169 A |
| ARG 168 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.38 ASP 136 A |
| ARG 176 A | 12.12 | 42 % | -1.09 | 400 | 0.00 | 0 | 0.24 ASP 128 A | 0.00 XXX 0 X | 0.47 ASP 128 A |
| ARG 185 A | 12.50 | 5 % | -0.52 | 296 | 0.00 | 0 | 0.00 GLU 188 A | 0.00 XXX 0 X | 0.01 ASP 187 A |
| ARG 185 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.31 GLU 188 A |
| ARG 185 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.07 TYR 262 A |
| ARG 185 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.12 GLU 276 A |
| ARG 229 A | 19.04 | 100 % | -3.81 | 683 | 0.00 | 0 | 0.00 TYR 56 A | 0.00 XXX 0 X | 1.27 TYR 11 A |
| ARG 229 A | | | | | | | 0.52 ASP 100 A | 0.00 XXX 0 X | 0.17 TYR 46 A |
| ARG 229 A | | | | | | | 0.51 ASP 231 A | 0.00 XXX 0 X | 2.03 TYR 56 A |
| ARG 229 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 2.03 ASP 100 A |
| ARG 229 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 1.42 ASP 231 A |
| ARG 229 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 1.64 GLU 261 A |
| ARG 229 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.73 ASP 328 A |
| ARG 246 A | 14.25 | 0 % | -0.32 | 276 | 0.00 | 0 | 1.56 GLU 280 A | 0.00 XXX 0 X | 0.10 ASP 243 A |
| ARG 246 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.40 GLU 280 A |
| ARG 249 A | 11.41 | 54 % | -1.36 | 432 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.09 TYR 228 A |
| ARG 249 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.03 ASP 255 A |
| ARG 249 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.17 GLU 280 A |
| ARG 249 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.01 ARG 246 A |
| ARG 294 A | 13.53 | 42 % | -1.24 | 398 | 0.00 | 0 | 1.37 ASP 265 A | 0.00 XXX 0 X | 0.06 TYR 290 A |
| ARG 294 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.25 TYR 302 A |
| ARG 294 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.59 ASP 265 A |
| ARG 305 A | 13.98 | 0 % | -0.40 | 224 | 0.00 | 0 | 1.50 ASP 303 A | 0.00 XXX 0 X | -0.04 NA NA A |
| ARG 305 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.03 ASP 401 A |
| ARG 305 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.02 ASP 404 A |
| ARG 305 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.38 ASP 303 A |
| ARG 309 A | 12.43 | 0 % | -0.29 | 248 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.09 TYR 302 A |
| ARG 309 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.08 ASP 303 A |
| ARG 309 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.07 GLU 314 A |
| ARG 309 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.02 ARG 305 A |
| ARG 354 A | 12.32 | 93 % | -2.88 | 541 | 0.00 | 0 | 1.56 ASP 398 A | 0.00 XXX 0 X | 0.16 GLU 355 A |
| ARG 354 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.97 ASP 398 A |
| ARG 388 A | 9.49 | 100 % | -3.10 | 570 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.14 TYR 358 A |
| ARG 388 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.21 TYR 393 A |
| ARG 388 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.26 ARG 410 A |
| ARG 410 A | 10.41 | 78 % | -2.42 | 501 | 0.00 | 0 | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.36 GLU 355 A |
| ARG 410 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.07 TYR 393 A |
| ARG 410 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | 0.04 ASP 398 A |
| ARG 410 A | | | | | | | 0.00 XXX 0 X | 0.00 XXX 0 X | -0.14 ARG 354 A |

KAYNAKLAR

- [1] Illanes, A. (2008) Introduction In Enzyme Biocatalysis: Principles And Applications, Illanes, A., Springer, 19-56.
- [2] Van Oort, M. (2010) Enzymes in Food Technology - Introduction, Whitehurst, R. J., Van Oort, M., Wiley-Blackwell, 1-17.
- [3] Novozymes A/S. (2012) The Novozymes Report 2011 (<http://report2011.novozymes.com/>).
- [4] Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. (2003) Microbial Alpha-Amylases: A Biotechnological Perspective. Process Biochemistry, 38, 1599-1616.
- [5] Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., Mohan, R. (2000) Advances In Microbial Amylases. Biotechnology and Applied Biochemistry, 31, 135-152.
- [6] De Souza, P. M., Magalhaes, P. D. E. (2010) Application Of Microbial Alpha-Amylase in Industry- A Review. Brazilian Journal of Microbiology, 41, 850-861.
- [7] Hmidet, N., Maalej, H., Haddar, A., Nasri, M. (2010) A Novel Alpha-Amylase From *Bacillus mojavensis* A21: Purification And Biochemical Characterization. Applied Biochemistry and Biotechnology, 162, 1018-1030.
- [8] Prakash, O., Jaiswal, N. (2010) Alpha-Amylase: An Ideal Representative Of Thermostable Enzymes. Applied Biochemistry And Biotechnology, 160, 2401-2414.
- [9] Konsula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, A. (2004) Hydrolysis Of Starches By The Action Of An Alpha-Amylase From *Bacillus subtilis*. Process Biochemistry, 39, 1745-1749.
- [10] Mctigue, M. A., Kelly, C. T., Doyle, E. M., Fogarty, W. M. (1995) The Alkaline Amylase Of The Alkalophilic *Bacillus* Sp Imd-370. Enzyme And Microbial Technology, 17, 570-573.
- [11] Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A., Osman, G. (2003) Enzymatic Properties of A Novel Thermostable, Thermophilic, Alkaline And Chelator

Resistant Amylase From An Alkaliphilic *Bacillus sp* Isolate Ant-6. *Process Biochemistry*, 38, 1397-1403.

[12] Tanyildizi, M. S., Ozer, D., Elibol, M. (2007) Production Of Bacterial Alpha-Amylase By *B. amyloliquefaciens* Under Solid Substrate Fermentation. *Biochemistry Engineering Journal*, 37, 294-297.

[13] Saito, N. (1973) Thermophilic Extracellular Alpha-Amylase From *Bacillus licheniformis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 155, 290-298.

[14] Krishnan, T., Chandra, A. K. (1983) Purification And Characterization Of Alpha-Amylase From *Bacillus licheniformis* CUMC305. *Applied And Environmental Microbiology*, 46, 430-437.

[15] Morgan, F. J., Priest, F. G. (1981) Characterization of A Thermostable Alpha-Amylase From *Bacillus licheniformis* NCIB-6346. *Journal of Applied Bacteriology*, 50, 107-114.

[16] Goyal, N., Gupta, J. K., Soni, S. K. (2005) A Novel Raw Starch Digesting Thermostable Alpha-Amylase From *Bacillus sp* I-3 And Its Use in The Direct Hydrolysis Of Raw Potato Starch. *Enzymes and Microbial Technology.*, 37, 723-734.

[17] Sodhi, H. K., Sharma, K., Gupta, J. K., Soni, S. K. (2005) Production Of A Thermostable Alpha-Amylase From *Bacillus sp* PS-7 By Solid State Fermentation And Its Synergistic Use in The Hydrolysis of Malt Starch For Alcohol Production. *Process Biochemistry*, 40, 525-534.

[18] Asgher, M., Asad, M. J., Rahman, S. U., Legge, R. L. (2007) A Thermostable Alpha-Amylase From A Moderately Thermophilic *Bacillus subtilis* Strain For Starch Processing *Journal of Food Engineering*, 79, 950-955.

[19] Asoodeh, A., Chamani, J., Lagzian, M. (2010) A Novel Thermostable, Acidophilic Alpha-Amylase From A New Thermophilic "*Bacillus ferdowsicus*" Isolated From Ferdows Hot Mineral Spring in Iran: Purification And Biochemical Characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 289-297.

[20] Sajedi, R. H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B. A., Asoodeh, A., Moradian, F. (2005) A Ca-independent Alpha-Amylase That is Active and

Stable At Low pH From The *Bacillus* sp KR-8104. *Enzyme Microbial Technology*, 36, 666-671.

[21] Deutch, C. E. (2002) Characterization Of A Salt-Tolerant Extracellular α -Amylase From *Bacillus dipsosauri*. *Letters In Applied Microbiology*, 35, 78-84.

[22] Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., Guyot, J. P. (2000) Purification And Characterization Of An Extracellular Alpha-Amylase Produced By *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010(T), An Amyolytic Lactic Acid Bacterium. *Enzyme and Microbial Techonology*, 27, 406-413.

[23] Vihinen, M., Mantsala, P. (1990) Characterization Of A Thermostable *Bacillus Stearothermophilus* Alpha-Amylase. *Biotechnology And Applied Biochemistry*, 12, 427-435.

[24] Hayashida, S., Teramoto, Y., Inoue, T. (1988) Production And Characteristics Of Raw Potato Starch Digesting Alpha-Amylase From *Bacillus subtilis* 65. *Applied Environmental Microbiology*, 54, 1516-1522.

[25] Marco, J. L., Bataus, L. A., Valencia, F. F., Ulhoa, C. J., Astolfi, S., Felix, C. R. (1996) Purification And Characterization Of A Truncated *Bacillus subtilis* Alpha-Amylase Produced By *Escherichia coli*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 44, 746-752.

[26] Freer, S. N. (1993) Purification And Characterization Of The Extracellular Alpha-Amylase From *Streptococcus bovis* JB1. *Applied And Environmental Microbiology*, 59, 1398-1402.

[27] Kelly, C. T., Collins, B. S., Fogarty, W. M., Doyle, E. M. (1993) Mechanisms Of Action Of The Alpha-Amylase Of *Micromonospora melanospora*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 39, 599-603.

[28] Chung, Y. C., Kobayashi, T., Kanai, H., Akiba, T., Kudo, T. (1995) Purification And Properties Of Extracellular Amylase From The Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. *Applied And Environmental Microbiology*, 61, 1502-1506.

- [29] Bhella, R. S., Altosaar, I. (1985) Purification And Some Properties Of The Extracellular Alpha-Amylase From *Aspergillus awamori*. Canadian Journal of Microbiology, 31, 149-153.
- [30] Ramachandran, N., Sreekantiah, K. R., Murthy, V. S. (1979) Influence Of Media Composition On The Production Of Alpha-Amylase And Amyloglucosidase By A Strain Of *Aspergillus niger*. Starke, 31, 134-138.
- [31] Uguru, G. C., Akinyanju, J. F. A., Sani, A. (1997) The Use Of Sorghum For Thermostable Amylase Production From *Thermoactinomyces thalophilus*. Letters In Applied Microbiology, 25, 13-16.
- [32] Hernandez, M. S., Rodriguez, M. R., Guerra, N. P., Roses, R. P. (2006) Amylase Production By *Aspergillus niger* In Submerged Cultivation On Two Wastes From Food Industries. Journal of Food Engineering, 73, 93-100.
- [33] Rahardjo, Y. S. P., Weber, F. J., Haemers, S., Tramper, J., Rinzema, A. (2005) Aerial Mycelia Of *Aspergillus oryzae* Accelerate Alpha-Amylase Production In A Model Solid-State Fermentation System. Enzyme Microbial Technology, 36, 900-902.
- [34] Kajiwara, Y., Takeshima, N., Ohba, H., Omori, T., Shimoda, M., Wada, H. (1997) Production Of Acid-Stable Alpha-Amylase By *Aspergillus kawachii* During Barley Shochu-Koji Production. Journal of Fermentation Bioengineering, 84, 224-227.
- [35] Wanderley, K. J., Torres, F. A. G., Moraes, L. M. P., Ulhoa, C. J. (2004) Biochemistry Characterization Of Alpha-Amylase From The Yeast *Cryptococcus flavus*. Fems Microbiology Letters, 231, 165-169.
- [36] Siqueira, E. M. D., Mizuta, K., Giglio, J. R. (1997) *Pycnoporus sanguineus*: A Novel Source Of Alpha-Amylase. Mycoloy Research, 101, 188-190.
- [37] De Moraes, L. M. P., Astolfi, S., Ulhoa, C. J. (1999) Purification And Some Properties Of An Alpha-Amylase Glucoamylase Fusion Protein From *Saccharomyces Cerevisiae*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 15, 561-564.
- [38] Yabuki, M., Ono, N., Hoshino, K., Fukui, S. (1977) Rapid Induction Of Alpha-Amylase By Non-Growing Mycelia Of *Aspergillus oryzae*. Applied And Environmental Microbiology, 34, 1-6.

- [39] Duran, E., Leon, A., Barber, B., De Barber, C. B. (2001) Effect Of Low Molecular Weight Dextrins On Gelatinization And Retrogradation Of Starch. *European Food Research and Technology*, 212, 203-207.
- [40] Palacios, H. R., Schwarz, P. B., D'apponia, B. L. (2004) Effect Of Alpha-Amylases From Different Sources On The Retrogradation And Recrystallization Of Concentrated Wheat Starch Gels: Relationship To Bread Staling. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 52, 5978-5986.
- [41] Ben Messaoud, E., Ben Ali, M., Elleuch, N., Masmoudi, N. F., Bejar, S. (2004) Purification And Properties Of A Maltoheptaose- And Maltohexaose-Forming Amylase Produced By *Bacillus Subtilis* Us116. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 662-666.
- [42] Hashim, S. O., Delgado, O. D., Martinez, M. A., Kaul, R. H., Mulaa, F. J., Mattiasson, B. (2005) Alkaline Active Maltohexaose-Forming Alpha-Amylase From *Bacillus halodurans* Lbk 34. *Enzyme and Microbial Technology*., 36, 139-146.
- [43] Ben Ali, M., Mhiri, S., Mezghani, M., Bejar, S. (2001) Purification And Sequence Analysis Of The Atypical Maltohexaose-Forming Alpha-Amylase Of The *B.stearothermophilus* US100. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 537-542.
- [44] Kim, T. U., Gu, B. G., Jeong, J. Y., Byun, S. M., Shin, Y. C. (1995) Purification And Characterization Of A Maltotetraose-Forming Alkaline Alpha-Amylase From An Alkalophilic *Bacillus* strain, GM8901. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 3105-3112.
- [45] Takasaki, Y. (1985) Studies On Enzymatic Production Of Oligosaccharides .3. An Amylase Producing Maltotriose From *Bacillus subtilis*. *Agricultural Biological Chemistry*, 49, 1091-1097.
- [46] Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S., Gill, B. S. (2003) Morphological, Thermal And Rheological Properties Of Starches From Different Botanical Sources. *Food Chemistry*, 81, 219-231.
- [47] Polaina, J., Maccabe, A. P. (2007) *Industrial Enzymes: Structure, Function And Applications* Springer, The Netherlands.
- [48] Robyt, J. F., French, D. (1970) Multiple Attack And Polarity Of Action Of Porcine Pancreatic A-Amylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 138, 662-670.

- [49] Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S., Nagamine, T. (1995) Production Of Waxy (Amylosefree) Wheats. *Molecular And General Genetics*, 253-259.
- [50] Tang, H. J., Mitsunaga, T., Kawamura, Y. (2004) Relationship Between Functionality And Structure In Barley Starches. *Carbohydrate Polymers*, 57, 145-152.
- [51] Zhu, T., Jackson, D. S., Wehling, R. L., Geera, B. (2008) Comparison of Amylose Determination Methods And The Development Of A Dual Wavelength Iodine Binding Technique. *Cereal Chemistry*, 85, 51-58.
- [52] Ball, S., Guan, H. P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonna, P., Preiss, J. (1996) From Glycogen To Amylopectin: A Model For The Biogenesis Of The Plant Starch Granule. *Cell*, 86, 349-352.
- [53] Zobel, H. F. (1988) Molecules To Granules: A Comprehensive Review. *Starch/Stärke*, 40, 1-7.
- [54] Morrison, W. R. (1995) Starch Lipids And How They Relate To Starch Granule Structure And Functionality. *Cereal Foods World*, 40, 437-446.
- [55] Suortti, T., Gorenstein, M. V., Roger, P. (1998) Determination Of The Molecular Mass Of Amylose. *Journal of Chromatography A* 828, 515-521.
- [56] Ball, D. W., Hill, J. W., Scott, R. J. (2012) *The Basics Of General, Organic, And Biological Chemistry*, (2012), http://flatworldknowledge.lardbucket.org/books/the-basics-of-general-organic-and-biologicalchemistry/section_19_07.htm
- [57] Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. (1998) Starch Granules: Structure And Biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23, 85-112.
- [58]http://www.hammaddeler.com/index.php?option=com_content&view=article&id=210&Itemid=172.
- [59] Appelqvist, I. A. M., Debet, M. R. M. (1997) Starch-Biopolymer Interactions: A Review. *Food Reviews International* 13, 163-224.
- [60] Tester, R. F., Karkalas, J., Qi, X. (2004) Starch-Composition, Fine Structure And Architecture. *Journal of Cereal Science*, 39, 151-165.

- [61] Svensson, B. (1994) Protein Engineering In The Alpha-Amylase Family - Catalytic Mechanism, Substrate-Specificity, And Stability. *Plant Molecular Biology*, 25, 141-157.
- [62] Henrissat, B., Bairoch, A. (1993) New Families In The Classification Of Glycosyl Hydrolases Based On Amino-Acid-Sequence Similarities *Biochemistry Journal*, 293, 781-788.
- [63] Coutinho P. M., Henrissat B. (1999) Life With No Sugars? *Journal of Molecular Microbiology And Biotechnology*, 1:, 307-308.
- [64] Henrissat, B. (1991) A Classification Of Glycosyl Hydrolases Based On Amino-Acid-Sequence Similarities. *Biochemistry Journal*, 280, 309-316.
- [65] Bijttebier, A. (2009) Increased Insight In The Hydrolysis Of Starch By Amyolytic Enzymes. *Bio-Ingeneurwetenschappen Van De K.U.Leuven*, Phd. Thesis, 25-27.
- [66] Henrissat, B., Bairoch. (1996) Updating The Sequence-Based Classification Of Glycosyl Hydrolases. *Biochemistry Journal* 316, 695-696.
- [67] Van Der Maarel, M. J. E. C., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002) Properties And Applications Of Starch-Converting Enzymes Of The Alpha-Amylase Family. *Journal of Biotechnology* 94, 137-155.
- [68] Koshland, D. E. (1953) Stereochemistry And The Mechanism Of Enzymatic Reactions. *Biological Review*, 28, 416-436.
- [69] Uitdehaag, J. C. M., Mosi, R., Kalk, K. H., Van Der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., Withers, S. G., Dijkstra, B. W. (1999) X-Ray Structures Along The Reaction Pathway Of Cyclodextrin Glycosyltransferase Elucidate Catalysis In The Alpha-Amylase Family. *Nature Structural Biology*, 6, 432-436.
- [70] Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J.F, Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., Waley, S. G. (1975) Structure Of Chicken Muscle Triose Phosphate Isomerase Determined By Crystallography At 2.5 Å Resolution Using Amino Acid Sequence Data. *Nature* 255, 609-614.
- [71] Janecek, S., Svensson, B., Henrissat, B. (1997) Domain Evolution In The A-Amylase Family *Journal of Molecular Evolution*, 45, 322-331.

- [72] Lawson, C. L., Vanmontfort, R., Strokopytov, B., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Devries, G. E., Penninga, D., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B. W. (1994) Nucleotide-Sequence And X-Ray Structure Of Cyclodextrin Glycosyltransferase From *Bacillus circulans* Strain-251 In A Maltose-Dependent Crystal Form. *Journal of Molecular Biology*, 236, 590-600.
- [73] Holm, L., Koivula, A. K., Lehtovaara, P. M., Hemminki, A., Knowles, J. K. C. (1990) Random Mutagenesis Used To Probe The Structure And Function Of *Bacillus stearothermophilus* Alpha-Amylase. *Protein Engineering*, 3, 181-191.
- [74] Dalmia, B. K., Schutte, K., Nikolov, Z. L. (1995) Domain E Of *Bacillus macerans* Cyclodextrin Gluconotransferase: An Independent Starch-Binding Domain. *Biotechnology And Bioengineering*, 47, 575-584.
- [75] Nazmi, A. R., Remisch, T., Hinz, H. J. (2006) Ca-Binding To *Bacillus licheniformis* Alpha-Amylase (Bla). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453, 18-25.
- [76] Machius, M., Declerck, N., Huber, R., Wiegand, G. (1998) Activation Of *Bacillus licheniformis* Alpha-Amylase Through A Disorder Transition Of The Substrate-Binding Site Mediated By A Calcium-Sodium-Calcium Metal Triad. *Structure*, 6, 281-292.
- [77] Larson, S. B., Greenwood, A., Cascio, D., Day, J., Mcpherson, A. (1994) Refined Molecular-Structure Of Pig Pancreatic Alpha-Amylase At 2-Center-Dot-1 Angstrom Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 235, 1560-1584.
- [78] Koch, R., Zabłowski, P., Sprienat, A., Antranikian, G. (1990) Extremely Thermostable Amylolytic Enzyme From The Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus* *Fems Microbiology Letters*, 71, 21-26.
- [79] Malhotra, R., Noorwez, S. M., Satyanarayana, T. (2000) Production And Partial Characterization Of Thermostable And Calcium-Independent Alpha-Amylase Of An Extreme Thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 378-384.
- [80] Ghollasi, M., Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., Ghasemi, A. (2010) Engineering Of A *Bacillus* Alpha-Amylase With Improved Thermostability And Calcium Independency. *Applied Biochemistry and Biotechnology*., 162, 444-459.

- [81] Jorgensen, S., Vorgias, C. E., Antranikian, G. (1997) Cloning, Sequencing, Characterization, And Expression Of An Extracellular Alpha-Amylase From The Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* In *Escherichia coli* And *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 16335-16342.
- [82] Crabb, W. D., Mitchinson, C. (1997) Enzymes Involved In The Processing Of Starch To Sugars. *Trends in Biotechnology*, 15, 349-352.
- [83] Bhosale, S. H., Rao, M. B., Deshpande, V. V., . (1996) Molecular And Industrial Aspects Of Glucose Isomerase. *Microbiology Revolution* 60, 280-300.
- [84] Hmidet, N., Ali, N. E. H., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S. K., Nasri, M. (2009) Alkaline Proteases And Thermostable Alpha-Amylase Co-Produced By *Bacillus licheniformis* Nh1: Characterization And Potential Application As Detergent Additive. *Biochemistry Engineering Journal*, 47, 71-79.
- [85] Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C. (2002) Industrial Enzyme Applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 345-351.
- [86] Mitidieri, S., Martinelli, A. H., Schrank, A., Vainstein, M. H., . (2006) Enzymatic Detergent Formulation Containing Amylase From *Aspergillus niger*: A Comparative Study With Commercial Detergent Formulations. *Bioresource Technology*, 97, 1217-1224.
- [87] Feitkenhauer, H. (2003) Anaerobic Digestion Of Desizing Wastewater: Influence Of Pretreatment And Anionic Surfactant On Degradation And Intermediate Accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 250-258.
- [88] Bruinenberg, P., Hulst, A. C., Faber, A., Voogd, R. H. (1996) A Process For Surface Sizing Or Coating Of Paper European Patent Application, Ep 0,690,170 A1.
- [89] Hamer, R. (1995) *Enzymes In The Baking Industry*, Blackie Academic And Professional, Galsgow.
- [90] Cole, M. S. (1982) Antistaling Baking Composition. US Patent, US4320151. .
- [91] Diderichsen, B., Christiansen, L. (1988) Cloning Of A Maltogenic Alpha-Amylase From *Bacillus stearothermophilus*. *Fems Microbiology Letters*, 56, 53-60.

- [92] Gigras, P., Sahai, V., Gupta, R. (2002) Statistical Media Optimization And Production Of Its Alpha-Amylase From *Aspergillus oryzae* In A Bioreactor. *Current Microbiology*, 45, 203-208.
- [93] Moraes, L. M. P., Filho, S. A., Ulhoa, C. J.(1999) Purification And Some Properties Of An A-Amylase Glucoamylase Fusion Protein From *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology And Biotechnology*, 15, 561-564.
- [94] Miller, G. L. (1959) Use Of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination Of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- [95] Bajpai, P., Bajpai, P. K. (1989) High Temperature Alkaline Alpha-Amylase From *Bacillus licheniformis* Tcrdc-B13. *Biotechnology and Bioengineering* , 33, 72-78.
- [96] Feller, G., Payan, F., Theys, F., Qian, M. X., Haser, R., Gerday, C. (1994) Stability And Structural-Analysis Of Alpha-Amylase From The Antarctic Psychrophile *Alteromonas Haloplanctis*-A23. *European Journal of Biochemistry*, 222, 441-447.
- [97] Mctigue, M. A., Kelly, C. T., Doyle, E. M., Fogarty, W. M. (1995) The Alkaline Amylase Of The Alkaliphilic *Bacillus* sp Imd-370. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 570-573.
- [98] Lin, L. L., Chyau, C. C., Hsu, W. H. (1998) Production And Properties Of A Raw Starch Degrading Amylase From The Thermophilic And Alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28, 61-68.
- [99] D'amico, S., Gerday, C., Feller, G. (2000) Structural Similarities And Evolutionary Relationships In Chloride-Dependent Alpha-Amylases. *Gene*, 253, 95-105.
- [100] Kim, D. Y., Cha, C. H., Oh, W. S., Yoon, Y. J., Kim, J. W. (2004) Expression Of The Promoter For The Maltogenic Amylase Gene In *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Microbiology*, 42, 319-327.
- [101] Aiyer, P. V. D. (2004) Effect Of C:N Ratio On Alpha Amylase Production By *Bacillus Licheniformis* Spt 27. *African Journal of Biotechnology*, 3, 519-522.
- [102] Bernhardsdotter, E. C. M. J., Ng, J. D., Garriott, O. K., Pusey, M. L. (2005) Enzymic Properties Of An Alkaline Chelator-Resistant Alpha-Amylase From An Alkaliphilic *Bacillus* sp Isolate L1711. *Process Biochemistry*, 40, 2401-2408.

- [103] Mollania, N., Khajeh, K., Hosseinkhani, S., Dabirmanesh, B. (2010) Purification And Characterization Of A Thermostable Phytate Resistant Alpha-Amylase From *Geobacillus* sp LH8. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 27-36.
- [104] Ben Mabrouk, S., Aghajari, N., Ben Ali, M., Ben Messaoud, E., Juy, M., Haser, R., Bejar, S. (2011) Enhancement Of The Thermostability Of The Maltogenic Amylase Maus149 By Gly312Aala And Lys436Arg Substitutions. *Bioresource Technology*, 102, 1740-1746.
- [105] Zhang, X. Y., Qin, W. Q., Tian, X. D., Huang, M. (2011) Effect Of Microwave Irradiation On Secondary Structure Of Alpha-Amylase By Circular Dichroism. *Journal of Central South University Technology*, 18, 1029-1033.
- [106] Tawil, G., Vikso-Nielsen, A., Rolland-Sabate, A., Colonna, P., Buleon, A. (2012) Hydrolysis Of Concentrated Raw Starch: A New Very Efficient Alpha-Amylase From *Anoxybacillus Flavothermus*. *Carbohydrate Polymers*, 87, 46-52.
- [107] Kumar, S., Khare, S. K. (2012) Purification And Characterization Of Maltooligosaccharide-Forming Alpha-Amylase From Moderately Halophilic *Marinobacter* sp. EMB8. *Bioresources Technology*, 116, 247-251.
- [108] Sneath, P. H. A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. And Holt, J. G. (1986) *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*, Williams And Wilkins, Baltimore, 1104-1139.
- [109] Tamer, A. Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Busalıoğlu, M., Oğultekin, R. (1989) *Mikrobiyoloji Laboratuvarı Klavuzu*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Teks, İzmir.
- [110] Nielsen, P., Fritze, D., Priest, F. G. (1995) Phenetic Diversity Of Alkaliphilic *Bacillus* Strains: Proposal For Nine New Species. *Microbiology Revolution*, 141 1745-1761.
- [111] Gerhardt, P., Murray R. G. E., Castilow E. W. N., Wood W. A., Krieg, R. N. (1981) *Manual Of Methods For General Bacteriology*, American Society Of Microbiology, Washington, D.C, USA.
- [112] 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. *Biotechnology Letters*, 27, 313-316.

- [113] Nomoto, M., Lee, T. C., Su, C. S., Liao, C. W., Yen, T. M., Yang, C. P. (1984) Alkaline Protease From Alkaliphilic Bacteria Of Taiwan. *Agricultural And Biochemical Chemistry*, 48, 1627-1628.
- [114] Gessesse, A. (1998) Purification And Properties Of Two Thermostable Alkaline Xylanase From An Alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3533-3535.
- [115] Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., Apajalahti, J. (1998) Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning, And Sequencing Of A Novel Phytase From *Bacillus subtilis*. *Applied And Environmental Microbiology*, 64, 2079-2085.
- [116] Rapp, P., Backhaus, S. (1992) Formation Of Extracellular Lipases By Filamentous Fungi, Yeast And Bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 938-943.
- [117] <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/k182001>
- [118] <http://corelabs.cgrb.oregonstate.edu/facilities/nanodrop>
- [119] <http://tr.medwv.com/med/capillary-electrophoresis-system/beckman-coulter/ceq-8000/31511.model-spec>
- [120] Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. (1997) The Clustal_X Windows Interface: Flexible Strategies For Multiple Sequence Alignment Aided By Quality Analysis Tools. *Nucleic Acid Research* 25, 4876-4882.
- [121] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Microbiology And Biotechnology*, 215, 403-410.
- [122] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) Gapped Blast And Psi-Blast: A New Generation Of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acid Res*, 25, 3389-3402.
- [123] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) Mega5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood,

Evolutionary Distance, And Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.

[124] Felsenstein, J. (1985) Confidence Limits On Phylogenies: An Approach Using The 222 Bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.

[125] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

[126] Hmidet, N., Bayouhd, A., Berrin, J. G., Kanoun, S., Juge, N., Nasri, M. (2008) Purification And Biochemistrical Characterization Of A Novel Alpha-Amylase From *Bacillus licheniformis* NH1 - Cloning, Nucleotide Sequence And Expression Of Amyn Gene In *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 43, 499-510.

[127] Shevchenko, M. W. A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M. (1996) Femtomole Sequencing Of Proteins From Polyacrylamide Gels By Nano-Electrospray Mass Spectrometry. *Nature*, 379, 466-469.

[128] Teotia, S., Gupta, M. N. (2001) Purification Of Alpha-Amylases Using Magnetic Alginate Beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90, 211-220.

[129] Sedmak J., G. S. (1977) A Rapid, Sensitive And Versatile Assay For Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Biochemistry*, 79, 544-552.

[130] Najafi, M. F., Deobagkar, D., Deobagkar, D. (2005) Purification And Characterization Of An Extracellular Alpha-Amylase From *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expresion and Purification*, 41, 349-354.

[131] Swain, M. R., Kar, S., Padmaja, G., Ray, R. C. (2006) Partial Characterization And Optimization Of Production Of Extracellular Alpha-Amylase From *Bacillus subtilis* Isolated From Culturable Cow Dung Microflora. *Polish Journal of Microbiology.*, 55, 289-296.

[132] Lim, J. M., Jeon, C. O., Kim, C. J. (2006) *Bacillus taeanensis* sp. Nov., A Halophilic Gram-Positive Bacterium From A Solar Saltern In Korea. *International Journal of Systematic Evolutional Microbiology*, 56, 2903-2908.

[133] Oguntoyinbo, F. A., Sanni, A. I., Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H. (2007) Phenotypic Diversity And Technological Properties Of *Bacillus subtilis* Species Isolated

From Okpehe, A Traditional Fermented Condiment. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23, 401-410.

[134] Song, Y., Yang, R., Guo, Z., Zhang, M., Wang, X., Zhou, F. (2000) Distinctness Of Spore And Vegetative Cellular Fatty Acid Profiles Of Some Aerobic Endospore-Forming *Bacilli*. Journal of Microbiology Methods, 39, 225-241.

[135] Saitou, N., Nei, M. (1987) The Neighbor-Joining Method: A New Method For Reconstructing Phylogenetic Trees. Molecular Biology And Evolution, 4, 406-425.

[136] Marmur, J. A. D., (1962) Determination Of The Base Composition Of Deoxyribonucleic Acid From Its Thermal Denaturation Temperature. Journal of Molecular Biology, 5, 109-118.

[137] Marmur, J., Doty, P. (1962) Determination Of The Base Composition Of Deoxyribonucleic Acid From Its Thermal Denaturation Temperature. Journal of Molecular Biology, 5, 109-118.

[138] Narang, S., Satyanarayana, T. (2001) Thermostable Alpha-Amylase Production By An Extreme Thermophile *Bacillus thermooleovorans*. Letters in Applied Microbiology, 32, 31-35.

[139] Babu, K. R., Satyanarayana, T. (1993) Extracellular Calcium-inhibited Alpha-Amylase Of *Bacillus coagulans* B-49. Enzyme Microbial Technology, 15, 1066-1069.

[140] Thippeswamy, S., Girigowda, K., Mulimani, V. H. (2006) Isolation And Identification Of Alpha-Amylase Producing *Bacillus* sp From Dhal Industry Waste. Indian Journal of Biochemistry and Biology., 43, 295-298.

[141] Hamilton, L. M., Kelly, C. T., Fogarty, W. M. (1999) Production And Properties Of The Raw Starch-Digesting Alpha-Amylase Of *Bacillus* sp IMD 435. Process Biochemistry, 35, 27-31.

[142] Dercova, K., Augustin, J., Krajcova, D. (1992) Cell-Growth And Alpha-Amylase Production Characteristics Of *Bacillus subtilis*. Folia Microbiology, 37, 17-23.

[143] Imai, Y., Suzuki, M., Masamoto, M., Nagayasu, K. (1993) Amylase Production By *Aspergillus oryzae* In A New Kind Of Fermenter With A Rotary Draft Tube. Journal of Fermentation and Bioengineering, 76, 459-464.

- [144] Castro, G. R., Baigori, M. D., Mendez, B. S., Sineriz, F. (1993) Effects Of pH and Temperature On The Continuous Production Of Amyolytic Enzymes By *Bacillus amyloliquefaciens* MIR-41. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 58, 277-280.
- [145] Nielsen, J. E., Borchert, T. V., Vriend, G. (2001) The determinants of alpha-amylase pH-activity Profiles. *Protein Engineering*, 14, 505-512.
- [146] Schwermann, B., Pfau, K., Liliensiek, B., Schleyer, M., Fischer, T., Bakker, E. P. (1994) Purification, Properties And Structural Aspects Of A Thermoacidophilic Alpha-Amylase From *Alicyclobacillus Acidocaldarius* Atcc-27009 - Insight Into Acidostability Of Proteins. *Eurepan Journal of Biochemistry*, 226, 981-991.
- [147] Nagarajan, D. R., Rajagopalan, G., Krishnan, C. (2006) Purification And Characterization Of A Maltooligosaccharide-Forming Alpha-Amylase From A New *Bacillus subtilis* KCC103. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 591-597.
- [148] Bolton, D. J., Kelly, C. T., Fogarty, W. M. (1997) Purification And Characterization Of The Alpha-Amylase Of *Bacillus flavothermus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 340-343.
- [149] Lee, S., Mouri, Y., Minoda, M., Oneda, H., Inouye, K. (2006) Comparison Of The Wild-Type Alpha-Amylase And Its Variant Enzymes In *Bacillus amyloliquefaciens* In Activity And Thermal Stability, And Insights Into Engineering The Thermal Stability Of *Bacillus* Alpha-Amylase. *Journal of Biochemistry*, 139, 1007-1015.
- [150] Liu, Y. H., Lu, F. P., Chen, G. Q., Snyder, C., Sun, J., Li, Y., Wang, J. L., Xiao, J. (2010) High-Level Expression, Purification And Characterization Of A Recombinant Medium-Temperature Alpha-Amylase From *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 32, 119-124.
- [151] Ray, R. C., Kar, S., Nayak, S., Swain, M. R. (2008) Extracellular Alpha-Amylase Production By *Bacillus brevis* MTCC 7521. *Food Biotechnology*, 22, 234-246.
- [152] Kikani, B. A., Singh, S. P. (2011) Single Step Purification And Characterization Of A Thermostable And Calcium Independent Alpha-Amylase From *Bacillus amyloliquifaciens* TSWKL-1 Isolated From Tulsi Shyam Hot Spring Reservoir, Gujarat (India). *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 676-681.

- [153] Kubrak, O. I., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I. (2010) Production And Properties Of Alpha-Amylase From *Bacillus* sp BKL20. Canadian Journal of Microbiology, 56, 279-288.
- [154] Murakami, S., Nishimoto, H., Toyama, Y., Shimamoto, E., Takenaka, S., Kaulpiboon, J., Prousoontorn, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., Aoki, K. (2007) Purification And Characterization Of Two Alkaline, Thermotolerant Alpha-Amylases From *Bacillus halodurans* 38C21 And Expression Of The Cloned Gene In *Escherichia coli*. Biosciences Biotechnology and Biochemistry, 71, 2393-2401.
- [155] Kubrak, O. I., Storey, J.M., Storey, K. B., Lushchak, V. I. (2010) Production and Properties Of Alpha-Amylase From *Bacillus* Sp BKL20. Canadian Journal of Microbiology, 56, 279-288.
- [156] Murakami, S., Nishimoto, H., Toyama, Y., Shimamoto, E., Takenaka, S., Kaulpiboon, J., Prousoontorn, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., Aoki, K. (2007) Purification And Characterization Of Two Alkaline, Thermotolerant Alpha-Amylases From *Bacillus halodurans* 38C21 And Expression Of The Cloned Gene In *Escherichia coli*. Biosciences Biotechnology and Biochemistry, 71, 2393-2401.
- [157] Najafi, M. F., Deobagkar, D., Deobagkar, D. (2005) Purification And Characterization Of An Extracellular Alpha-Amylase From *Bacillus subtilis* AX20. Protein Expression and Purification 41, 349-354.
- [158] Hmidet, N., Maalej, H., Haddar, A., Nasri, M. (2010) A Novel Alpha-Amylase From *Bacillus mojaviensis* A21: Purification And Biochemistrical Characterization. Applied Biochemistry and Biotechnology, 162, 1018-1030.
- [159] Ezeji, T. C., Bahl, H. (2006) Purification, Characterization, And Synergistic Action Of Phytate-Resistant Alpha-Amylase And Alpha-Glucosidase From *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. Journal of Biotechnology, 125, 27-38.
- [160] Asoodeh, A., Chamani, J., Lagzian, M. (2010) A Novel Thermostable, Acidophilic Alpha-Amylase From A New Thermophilic "*Bacillus sp ferdowsicus*" Isolated From Ferdows Hot Mineral Spring in Iran: Purification And Biochemistrical Characterization. International Journal of Biological Macromolecules, 46, 289-297.

- [161] Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Sivaramakrishnan, S., Pandey, A. (2009) Biochemistrical Characterization Of Raw-Starch-Digesting Alpha Amylase Purified From *Bacillus Amyloliquefaciens*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158, 653-662.
- [162] Liu, X. D., Xu, Y. (2008) A Novel Raw Starch Digesting Alpha-Amylase From A Newly Isolated *Bacillus* sp YX-1: Purification and Characterization. *Bioresource Technology*, 99, 4315-4320.
- [163] Rajagopalan, G., Krishnan, C. (2008) Alpha-Amylase Production From Catabolite Depressed *Bacillus subtilis* KCC103 Utilizing Sugarcane Bagasse Hydrolysate. *Bioresource Technology*, 99, 3044-3050.
- [164] Shida, O., Takano, T., Takagi, H., Kadowaki, K., Kobayashi, S. (1992) Cloning And Nucleotide Sequence Of The Maltopentaose-Forming Amylase Gene From *Pseudomonas* sp KO-8940. *Biosciences Biotechnology and Biochemisrty*, 56, 76-80.
- [165] Michelin, M., Silva, T. M., Benassi, V. M., Peixoto-Nogueira, S. C., Moraes, L. A. B., Leao, J. M., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Polizeli, M. D. T. M. (2010) Purification And Characterization Of A Thermostable Alpha-Amylase Produced By The Fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydrates Research*, 345, 2348-2353.
- [166]Safarikova, M., Roy, I., Gupta, M. N., Safarik, I. (2003) Magnetic Alginate Microparticles For Purification Of Alpha-Amylases. *Journal of Biotechnology* 105 255-260.
- [167] Roy, I., Sardar, M., Gupta, M. N. (2000) Exploiting Unusual Affinity Of Usual Polysaccharides For Separation Of Enzymes On Fluidized Beds. *Enzyme Microbial Technology*, 27, 53-65.
- [168] Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G. (1990) Alginate As Immobilization Matrix For Cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71-78.
- [169] Gombotz, W. R., Wee, S. (1998) Protein Release From Alginate Matrices. *Advances in Drug Delivery Review*, 31, 267-285.
- [170] Teotia, S., Gupta, M. N. (2001) Purification Of Alpha-Amylases Using Magnetic Alginate Beads. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 90, 211-220

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : HASAN ÜMİT ÖZTÜRK
Doğum Yeri ve Tarihi : ANKARA 17/09/1975
Yabancı Dili : İngilizce (iyi), Japonca(başlangıç),
Almanca(Başlangıç)
E-Posta : umit.ozturk@tubitak.gov.tr

Öğrenim Durumu

| Derece | Bölüm/Program | Üniversite/Lise | Mezuniyet Yılı |
|------------|-----------------|-------------------------------|----------------|
| Lise | FEN | Özel Yükseliş Koleji II | 1993 |
| Üniversite | Biyoloji | Orta Doğu Teknik Üniversitesi | 1999 |
| Y. Lisans | Biyomühendislik | Sabancı Üniversitesi | 2003 |

İş Deneyimi

| Yıl | Firma/Kurum | Görevi |
|-----------|----------------------|---------------------------------|
| 1999- | TÜBİTAK MAM GMBE | Araştırmacı |
| 2010-2012 | TÜBİTAK MAM GMBE | Enstitü Kurul Üyeliği |
| 2000- | TÜBİTAK MAM GMBE | Staj Koordinatörü |
| 2000-2005 | TÜBİTAK MAM GMBE | Biyoinformatik Birim Yöneticisi |
| 2004-2006 | TÜBİTAK MAM GMBE | Tanıtım Sorumlusu |
| 2000-2003 | Sabancı Üniversitesi | Öğrenci Asistanlığı |
| 1999 | ODTÜ | Bilgisayar Asistanlığı |

Bilimsel Eserler:

Yayınlar

- **H.Umit.Ozturk** A.Akın Denizci, Ayse Ogan, Dilek Kazan (2013) Amaltooligosaccaride- forming α -amylase from *Bacillus subtilis* SDP1 isolated from rhizosphere of *Acacia cyanophylla* Lindley. Annals of Microbiology (submitted)
- Kivanc Bilecen, **Umit H. Ozturk**, Adil D. Duru, Tolga Sutlu, Maxim V. Petoukhov, Dimitri I. Svergun, Michel H. J. F Koch, Ugur O. Sezerman, Ismail Cakmak, and Zehra Sayers (2005) *Triticum durum* Metallothionein: Isolation Of The Gene And Structural Characterization Of The Protein Using Solution Scattering And Molecular Modeling Journal of Biological Chemistry, Vol. 280, Issue 14, 13701-13711, April 8, (İmpact Factor: 5,498 Cited: 42)
- KAZAN, D., Bal, H., Denizci, A., Öztürk, N., **Öztürk, U.**, Dilgimen, A. s., Öztürk, D. & Erarslan, A. (2009). Studİes On Alkalİne Serİne Protease Produced By *Bacillus clausii* GMBE 22. Preparative Biochemistryistry and Biotechnology. Sayı -. Cilt DOI: 10.1080/10826060902953269 sf ((İmpact Factor: 0,711 Cited: 5)
- Cloning, Characterization and expression of a novel metallothionein gene (mt-d) from *Triticum durum* Master Thesis /Sabanci University 2003

Bildiriler ve Posterler

- **H. Umit Ozturk**, Aziz Akın Denizci, Guldem Utkan "Fast Microbial Production of Gold Nanoparticles for Nanobiotechnology” TERMIS-EU 2013-İstanbul (abstract kabul edildi)
- **H. Umit Ozturk**, Kamil Serkan Uzyol, Aziz Akın Denizci, Guldem Utkan “Rapid biosynthesis of gold nanoparticles using novel *Citrobacter* sp. isolated from *Reticulitermes clypeatus*” Nano-TR9 Kongresi 24-28 Haziran 2013 Erzurum (abstract gönderildi)
- **H. Umit Ozturk**, Dilek Kazan, Aziz Akın Denizci, Guldem Utkan “Application of magnetic alginate beads in both in bioseparation and immobilization of *Bacillus subtilis* SDP1 α -amylase” Nano-TR-9 Kongresi 24-28 Haziran 2013 Erzurum (abstract gönderildi).

- Melis S. SOGUT, Abdulmecit GOKCE, Deniz KARAS, Sevnur MANDACI, Orkun PINAR, **H. Umit OZTURK**, et.al “Cloning, Overexpression and Characterization of the Bacillus Phytase Encoding Gene, YMNphyA, in E.coli- European Biotechnology Congress 16-18 Mayıs 2013-Slovakya (poster)
- **U, Ozturk N**, Denizci AA, Utkan G and Dilek Kazan "Osmoadaptation of a moderately halophilic microorganisms under cold stress". 15th European Congress on Biotechnology of the European Federation of Biotechnology ECB15, 23-26 September İstanbul. (2012)
- **Ozturk HU**, Ozturk NC, Poli A, Ayan B, Denizci AA, Utkan G, Akbulut BS and Kazan D., "Adaptive changes in the lipid distribution of a moderately halophilic microorganism under salt stress." 15th European Congress on Biotechnology of the European Federation of Biotechnology ECB15, 23-26 September İstanbul. (2012)
- Melis S. SOGUT1, Nurcin C. OZTURK1, **H. Umit OZTURK** et al "Production of industrial enzymes for feed industry", 15th European Congress on Biotechnology of the European Federation of Biotechnology ECB15, 23-26 September İstanbul. (2012)
- **Hasan Umit Ozturk**, Guldem Utkan, Aziz Akın Denizci, Dilek Kazan (2011) “Fast Biosynthesis of Silver and Gold Nanoparticles by Microwave Irradiation” **7th Nanoscience and Nanotechnology Conference** 27 Haziran- 01 Temmuz, İstanbul
- **Öztürk, U**, Denizci, A., Dincer S., Ogan A., Erarslan A, Kazan, D (2010) “Amylase and cellulase producer Bacillus strain isolated from rhizosphere of *Acacia cyanophylla Lindley*” **Vth. International Bioengineering Congress (BEC 2010)** 16-19 Haziran –İzmir (Sözlü Sunum)
- **Öztürk, U**, Denizci, A., Dincer S., Ogan A., Erarslan A, Kazan, D (2009) “Production and characterization of thermostable phytase from Bacillus strain isolated from rhizosphere of *Acacia cyanophylla Lindley*” **III. International Conference on Enviromental,Industrial and Applied Microbiology 2-4 Aralık 2009 “BioMicroWorld 2009”** Lisbon-Portekiz (Sözlü sunum)

- **Öztürk, U.**, Denizci, A., Dincer S., Ogan A., Erarslan A, Kazan, D (2009) “Phytase from Bacillus strain isolated from rhizosphere of Acacia cyanophylla Lindley” **34. FEBS Congress** 04-09 Temmuz Prag-Çekoslavya
- Bilecen, K., **Ozturk, U.**, Sezerman, U., Sayers, Z (2002) "A new metallothionein protein from pasta wheat (T. durum): structure prediction using homology modeling. "**Functional Genomics; The Future of Biology**", October 13-16. European Molecular Biology Organization/EMBL Heidelberg, Germany

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. 7.Çerçeve Projesi “Turning Biowaste into Sustainable Products:Development of Appropriate Conversion Technologies Applicable in Developing Countries”
Proje Personeli
2. Ticari Proje, Kamu Destekli, (2011-2012), Proje personeli, Proje Bütçesi :725,700 TL,
3. TARAL 1001 “Biyoteknolojik Uygulamalarda Doğal Ürün Kaynağı Ekstremofiller: Mühendislik Prensipleri İle Ozmoregülasyon Stratejilerinin İncelenmesi 2010-2012 Araştırmacı
4. Ticari Proje, Kamu Destekli, (2009-2010), Proje personeli, Proje Bütçesi 339,500 TL
5. TARAL KAMAG 1007: “Yem Endüstrisine Yönelik Endüstriyel Enzimlerin Üretimi (YEM-EN) (proje no: 107G246), 2008-2012, Proje personeli
6. TARAL KAMAG 1007 Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının In Vitro Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması-1 (TURKHAYGEN-1) 2007-2011, Proje personeli Proje Bütçesi: 9.126.532 TL
7. Mayın Yerine Alternatif Sistemler Geliştirilmesi Etüd Projesi MSB 2008-2010
8. TÜBİTAK MAM GMBE-DPT projesi “Türkiye’de Enzim Endüstrisine Yönelik Mikroorganizma Kaynak Merkezi Alt Yapısının Oluşturulması”, 2007-2010 Proje personeli
9. TÜBİTAK MAM GMBE projesi. T1001(105S363) “BIOCENEX: İşlevsel Genomik Alanında TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma

Enstitüsü'nün Bilimsel ve Teknik Araştırma Kapasitesinin Güçlendirilmesi"
Proje personeli

10. Julich Project 2001-2003 Yüksek Lisans Tez Projesi

11. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi "Akasya Ağacı Toprağından İzole Edilen Bacillus Sp. Tarafından Üretilen Endüstriyel Enzimlerin Araştırılması BAPKO FEN-C-DRP-171108-0267(2008-2010)

12. DETAM-Lösemi Hasta veri sistemi geliştirme projesi "Ticari Proje"

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

1. Türk Biyokimya Derneği

Burslar ve Ödüller:

Burslar

ICGEB Bursu 19-24 Nisan 2010 Tunus

JAPAN International Agency Bursu ile) 19.03.2007-11.08.2007 Japonya

IAESTE Bursu 2001 (2.5 ay) Stuttgart, Almanya

Dünya Bankası Kısa Süreli Eğitim Bursu Rehovolt, İsrail 2000 (1 ay) Sabancı Üniversitesi Eğitim Bursu (2000-2003)

Ödüller

TÜBİTAK Proje Teşvik Ödülü

