

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seçil Berna KUZU

KİTİNAZ ÜRETEN BACILLUS
İZOLASYONU, ENZİMİN KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU

BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

ADANA, 2008

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİTİNAZ ÜRETEB BACİLLUS
İZOLASYONU, ENZİMİN KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU

Seçil Berna KUZU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu Tez / /2008 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri tarafından Oy Birliğı/Oy Çokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....

Doç.Dr. Hatice KORKMAZ

GÜVENMEZ

DANIŞMAN

İmza.....

Prof.Dr. Burhan ARIKAN

ÜYE

İmza.....

Doç.Dr. Nisa ÜNALDI

CORAL

ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ

Enstitü Müdürü

İmza ve Mühür

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KİTİNAZ ÜRETEN BACILLUS
İZOLASYONU, ENZİMİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Seçil Berna KUZU

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FENBİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİMDALI

Danışman : Doç. Dr. Hatice KORKMAZ

Yıl : 2008, Sayfa: 82

Jüri : Doç. Dr. Hatice KORKMAZ

Prof. Dr. Burhan ARIKAN

Doç. Dr. Nisa ÜNALDI CORAL

Bu çalışmada kitinaz üreticisi *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 suşu kitin içeren doğal ortamdan izole edilmiş, biyokimyasal ve morfolojik özelliklerin yanı sıra yağ asiti ve 16S RNA dizi analizlerine göre tanımlanmıştır.

B. thuringiensis HBK-51 suşunun kültür süpernatantından elde edilen kitinaz, geniş pH (3.0-11.0) ve sıcaklık (30-120 °C) aralığında aktivite göstermiştir. Optimum aktivite pH 9.0 ve 110 °C'de gözlenmiştir. Enzim, 3 saatlik ön inkübasyondan sonra; pH 9.0-12.0 aralığında (%98 kalan aktivite) ve 110 °C'de (%96 kalan aktivite) yüksek düzeyde aktivite göstermiştir. Bu özellikleri dikkate alındığında; hipertermofil-termostabil ve alkali olarak tanımlanmıştır. %12'lik SDS-PAGE analizi ile 50 ve 125 kDa boyutlarında enzimin 2 izoformu saptanmıştır. NiCl₂ (%32), KCl (%44) ve CuCl₂ (%56) gibi metal iyonları aktivite artışına, EDTA (%7), SDS (%7), HgCl₂ (%11) ve Etil-Asetimidat (%20) aktivite azalmasına neden olmuştur.

Sonuç olarak *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 suşu kitinaz üreticisi olarak biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilecek önemli bir suştur. Üretilen enzim, biyoinsektisit/fungisit olarak, kitin içeren atıkların biyodegradasyonunda ve kitobioz üretimini içeren proseslerde kullanılabilecek özelliktedir.

Anahtar Kelimeler: Kitinaz, *Bacillus*, Bioinsektisit, Biodegradasyon

ABSTRACT
MSc THESIS

**ISOLATION OF BACILLUS PRODUCING CHITINASE, PARTIAL
PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENZYME**

Seçil Berna KUZU

ÇUKUROVA UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL
AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Assoc.Prof.Dr.Hatice KORKMAZ

Year: 2008, Page: 82

Jury : Assoc.Prof.Dr.Hatice KORKMAZ

Prof. Dr. Burhan ARIKAN

Assoc. Prof.Dr. NİSA ÜNALDI

In this study, strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 which produce chitinase was isolated from natural environment and its biochemical and morphological characteristics, fatty acid composition and 16S RNA sequence analysis were described.

Chitinase which obtained from the supernatant of *B. thuringiensis* HBK-51 strain showed its optimum activity at 110 °C and at pH 9.0. Following 3 hours of incubation period, the enzyme showed a high level of activity at 110 °C (96 % remaining activity) and between pH 9.0-12.0 (98% remaining activity). Considering these characteristics, the enzyme described as hyperthermophile-thermostable and alkaline. Two isoforms of the enzyme weighing 50 and 125 kDa were obtained following 12% SDS-PAGE analysis. Some metal ions such as NiCl₂ (32%), KCl (44%) ve CuCl₂ (56%) increased the enzyme activity while EDTA (7%), SDS (7%), HgCl₂ (11%) and Etil-Asetimidat (20%) caused a decline in the activity of the enzyme.

As a result, strain of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 is an important strain which can be used in biotechnological applications as a chitinase producer. The enzyme produced in this way may be applicable as insecticides/fungicides, as well as in the biodegradation of chitin wastes and chitobiose production.

Key Words: Chitinase, *Bacillus*, Bioinsectisid, Biodegradation.

TEŞEKKÜR

Tezim sırasında her türlü desteğini ve yardımını benden esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ’e teşekkürlerimi sunarım.

Prof. Dr. Burhan ARIKAN, Prof. Dr. Sadık DİNÇER, Prof. Dr. Mustafa CANLI, araştırma görevlileri Ashabil AYGAN, Ayşenur KAYA ve Gülcihan GÜZELDAĞ’a çalışmalarımda bana destek oldukları için teşekkür ederim.

Kitinaz üreticisi olarak bu çalışmada kullandığım *Bacillus* suşunun moleküler düzeyde tanımlanmasını gerçekleştiren Dr. Akın DENİZCİ’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans çalışmam süresince bana destek veren arkadaşlarım; Çağlar TİMOÇİN, Bestami TAMBAĞ, Nihal İNANDIKLIOĞLU, Mustafa Naci KARAKAYA, Asu KIVRAKDAL, Emre KOŞAR, Ayşe Ummuhan AKARCA, Aysun AVCU, Kevser DEMİRÖZ, Barış KURAN, Emre Tankut AKSÖZ, Veli Emre AKKURT, Yılmaz SARIBAY, Yiğit ATA, Mustafa Necip KAYTANCI, Gökhan YILMAZ, Gaye MIZRAK, Emine Dilek ÇİMRİN, Gökhan KARACAOĞLAN, Can AKIN, Kayacan AKIN, Yeliz CEBECİ, Güneş KIZGIN’a teşekkürler.

Ayrıca öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi açıdan destekleyen herşeyim CANIM AİLEM’e tüm yardımları için teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

sayfa

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİL DİZİNİ	IX
1.GİRİŞ	1
1.1.Kitin ve Kitinazlar	2
1.2. <i>Bacillus</i>	5
1.3.Enzimler	6
1.3.1. Enzimlerin Yapısı.....	7
1.3.2. Enzimlerin Kod numaralarına göre sınıflandırılması	9
1.3.3. Enzimlerin kullanım alanları	12
1.4. Elektroforez	15
1.4.1. SDS-PAGE Sistemi	15
1.5. Plasmid Curing (Plasmid Eliminasyonu)	16
AMAÇ	17
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	18
3.MATERYAL VE METOD	23
3.1.Materyal.....	23
3.1.1 Bakterilerin üretilmesinde kullanılan besiyerleri	23
3.1.1.1. Kitinli LB besiyeri (luria-bertoni broth)	23
3.1.1.2. Jeloz besiyeri	23
3.1.1.3. N1 besiyeri.....	24
3.1.1.4. CHDA agar	24
3.1.1.5. Üre agar	25
3.1.1.6. Simon's Sitrat Agar.....	26
3.1.1.7. Jelatin besiyeri	26

3.1.1.8. Yumurtalı agar (egg yolk agar).....	26
3.1.1.9. Clark-lups besiyeri (methyl red-voges proskauer broth)	27
3.1.1.10. İndol besiyeri (tryptophane-peptone broth).....	27
3.1.1.11. Nişasta besiyeri.....	28
3.1.1.12. Kanlı (Blood) agar	28
3.1.2. Kullanılan tampon ve çözeltiler.....	29
3.1.2.1. Lugol çözeltisi	29
3.1.2.2. Sitrat tamponu.....	29
3.1.2.3. Sodyum-Fosfat tamponu	30
3.1.2.4. Glisin-NaOH tamponu	30
3.1.2.5. Borax-NaOH tamponu	31
3.1.2.6 Chitin-azure	31
3.1.3. Elektroforez uygulamalarında kullanılan çözeltiler.....	31
3.1.3.1. Solusyon-A(acrylamide stok solusyonu)	31
3.1.3.2. Solusyon-B (4X separating jel tamponu).....	32
3.1.3.3. Solusyon-C (4X stacking jel tamonu).....	32
3.1.3.4. AMPS (%10 amonyum persülfat).....	32
3.1.3.5. Elektroforez tamponu.....	33
3.1.3.6. Örnek tamponu (5X sample buffer).....	33
3.1.3.7. TEMED	34
3.1.3.8. SDS-PAGE boyama solusyonu	34
3.1.3.9. Jelden boyayı geri alma solusyonu(destaining).....	34
3.1.3.10. İstenilen konsantrasyonda (%X) ayırıcı jelin hazırlanması.....	35
3.1.4. Kitinaz aktivitesi üzerine kimyasalların etkisini ortaya koymak için kullanılan kimyasallar	35
3.2. Metod	36
3.2.1. Topraktan Bacillus sp. Suşlarının izolasyonu	36
3.2.2. Kitinaz üreten suşların CHDA agarda saptanması	36
3.2.3. Plasmid eliminasyon(curing).....	37
3.2.4. Bakterilerin İdentifikasyonu.....	37

3.2.5. İdentifikasyon amacı ile uygulanan biyokimyasal testler ve metodolojileri	38
3.2.5.1. β -Hemoliz testi	38
3.2.5.2. Katalaz testi	38
3.2.5.3. Jelatinin hidrolizi	38
3.2.5.4. Hareket testi.....	38
3.2.5.5. Simon's sitrat testi.....	39
3.2.5.6. İndol testi.....	39
3.2.5.7. Voges-proskauer testi.....	39
3.2.5.8. Lesitinin hidrolizi.....	40
3.2.5.9. Ürenin hidrolizi.....	40
3.2.5.10. Nişastanın hidrolizi testi.....	40
3.2.5.11. <i>Bacillus</i> HBK-51 Suşunun 16S RNA Analizi	40
3.2.6. Kolloidal kitinin hazırlanması	42
3.2.7. Enzim (kitinaz) üretimi	42
3.2.8. Enzimin kısmi saflaştırılması (ethanol ile presipitasyon)	42
3.2.9. Besiyerinde kitinaz aktivitesinin saptanması	43
3.2.10. Kitinaz aktivitesinin kitin-azure ile saptanması.....	43
3.2.11. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerini saptanması	44
3.2.12. Enzimin optimum aktivites gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması.	44
3.2.13. Enzimin sıcaklık stabilitesinin saptanması.....	45
3.2.14. Enzimin pH stabilitesinin saptanması.....	45
3.2.15. Çeşitli kimyasalların enzim aktiviteleri üzerine etkileri	46
3.2.16. SDS-PAGE yöntemi ile enzimin moleküler ağırlığının saptanması....	46
3.2.17. Kitinaz enziminin kalorifer böcekleri üzerine etkisi	47
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	48
4.1. Topraktan <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının izolasyonu	48
4.2. Kitinaz üreten suşların CHDA agarda saptanması	48
4.3. Plasmid curing (eliminasyon) sonuçları.....	49
4.4. Bakteri identifikasyonu	50

4.5 Enzim (kitinaz) üretimi	52
4.6. Kitinazın moleküler ağırlığının hesaplanması.....	53
4.7. Optimum sıcaklık.....	54
4.8. Termal stabilite	56
4.9. Optimum pH.....	57
4.10 pH stabilitesi.....	59
4.11. Kitinaz aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların etkisi	61
4.12. Kitinazın kalorifer böcekleri üzerine etkisi	64
 5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	 66
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

sayfa

Çizelge 1.1. Enzimlerin kod numaralarına göre sınıflandırılması.....	10
Çizelge 1.2 Enzimlerin sınıflandırılması	11
Çizelge 1.3. Enzim kaynakları ve kullanım alanları.....	14
Çizelge 3.1 Sitrik asit tampon çözeltilerinin hazırlanma	29
Çizelge 3.2. Sodyum-Fosfat tampon çözeltilerinin hazırlanması.....	30
Çizelge 3.3. Glisin-NaOH tampon çözeltilerinin hazırlanması.....	30
Çizelge 4.1. HBK-51 suşunun identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler .	52
Çizelge 4.2. Bazı kimyasalların kitinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

sayfa

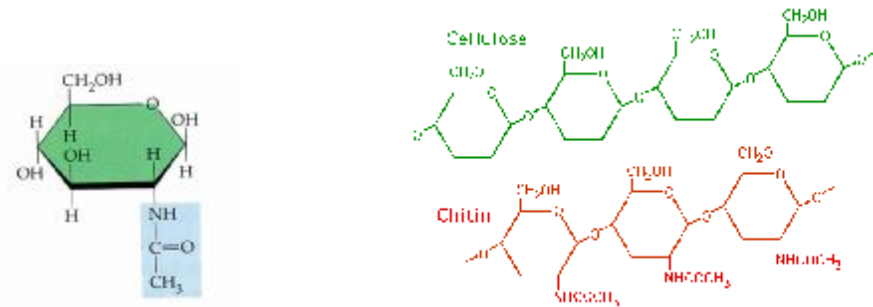
Şekil 1.1. Kitinin açık formülü.....	2
Şekil 1.2 Kitinaz enzimin 3 boyutlu yapısı.....	3
Şekil 1.3. Enzim substrat yapısı	8
Şekil 1.4. Anahtar-kilit modeli	9
Şekil 4.1. CHDA’da kitinaz aktivitesi	49
Şekil 4.2. Gram boyamanın mikroskopik görüntüsü.....	50
Şekil 4.3. Simon’s sitrat agarda pozitif sonuç.....	51
Şekil 4.4. Nişastanın hidrolizi	51
Şekil 4.5. Kanlı besiyerinde β -hemoliz.....	51
Şekil 4.6. SDS-PAGE’de moleküler ağırlığın gösterilmesi.....	53
Şekil 4. 7. Kitinaz aktivitesi üzerine sıcaklığın ($^{\circ}\text{C}$) etkisi	55
Şekil 4.8. Kitinaz enziminin sıcaklık stabilitesi	56
Şekil 4.9. Kitinaz Aktivitesi Üzerine pH’nın Etkisi	59
Şekil 4. 10. Kitinaz Enziminin pH Stabilitesi	60
Şekil 4.11 Kalorifer böceklerinin kitinaz enzimi ile muamelesi sonucu 1. günde makroskopik görünüm.....	65
Şekil 4.12. Kalorifer böceklerinin kitinaz enzimi ile muamelesi sonucu 5. Günde makroskopik görünüm.....	65

1.GİRİŞ

Enzimler, canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentez edilmelerine rağmen, aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları gerekmez. Enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayatta önemli düzeyde kullanılmaktadırlar. Ekonomik sahalarda; ekmek, bira ve peynir üretimi gibi, günlük yaşamda, temizlik alanlarında, ayrıca tıpta teşhis ve tedavide önemli rol oynamaktadırlar. Kimya endüstrisinde, gıda proseslerinde, ziraatta ve hatta biyolojik savaşta da pek çok kullanım alanları bulunmaktadır. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genelde mikroorganizmalardan elde edilirler. Çünkü mikrobiyal enzimler; bitkisel ve hayvansal ayrıca kimyasal olarak üretilen enzimlere göre önemli avantajlara sahiptirler. Katalitik aktiviteleri çok yüksektir, istenmeyen yan ürünler oluşmaz, daha stabil ve ucuzdur, ayrıca bir üretim prosesinde çok fazla miktarda üretmek mümkündür (Zeman ve Mcree, 1985; Wiseman, 1987). Mikroorganizmalar üremeleri, metabolizmaları ve otoliz olaylarının gerçekleşmesi için pek çok enzimi sentezler. Bu enzimlerin çoğu hücrenin içinde çevreden korunmuş olarak iş görmektedir. Fakat bazıları hücrenin dışına salgılanarak etkinliğini gösterebilir, bunlara ekstrasellüler enzimler denir. Ekstrasellüler enzimler, ortamda bulunan yüksek molekül ağırlıklı besin maddelerini hidroliz ederek mikroorganizma tarafından alınabilir forma dönüştürürler. Bu enzimlere genel olarak hidrolazlar denir. Ekstrasellüler enzimler mikroorganizmanın ürettiği/üretildiği ortama salındığı için, ortamın fiziksel ve kimyasal özelliklerine karşı kendisini stabil kılan bazı özelliklere sahip olması gerekir. Mikroorganizma için gerekli, ise fazla miktarda üretilir, söz konusu enzimin substratı ortamda bulunursa enzim üretimi indüklenebilir. Bu özelliği sayesinde, ekstrasellüler enzimler endüstriyel alanlarda kullanılmak için uygun ve vazgeçilmez moleküller haline gelmiştir. Günümüzde mikrobiyal enzimlerin pek çoğu önemli araştırma konusu haline gelmiş, dünyanın hemen her yerinde üretilmeye, sanayi, endüstri alanında kullanılmaya başlanmıştır. Endüstri alanında kullanılan pek çok mikrobiyal enzimin *Bacillus* cinsine ait türler tarafından sentezlendiği bilinmektedir (Kalisz, 1988).

1.1. Kitin ve Kitinazlar

Kitin polimerleri böceklerin dış iskelet yapılarında, Crustacea'ların kabuklarında, birçok mantar ve olgun hücre duvarında ve nematodlarda yapısal element olarak (Chanpen ve ark., 1999) bulunan ve N-asetil glukozamin rezidülerinin β ,1-4 bağlanması ile oluşmuş bir polisakkarit olup en çok görülen doğal polimerlerdendir. Kitin formları uzun düz zincirler ihtiva eden yapılardır. Bu sebepten selüloza benzer bir özellik gösterir, fakat yapısında selülozdan farklı olarak hidroksil grupları yerine asetilasyona uğramış amino gruplar bulundurmaktadır (Stryer, 1988, Madigan ve ark., 1997). Kitosan yine kabuklularda bulunur. Kitin ve kitosan, kalsiyumu bağlar ve proteinlerle kovalent bağlar oluştururlar. Proteinler diğer karbonhidratlar için bağlayıcı görev yapar. Bu kopolimer eğer %7 den daha az azot ihtiva ediyorsa *kitin* olarak tanımlanır. *Mucor rouxii*'den elde edilen kitin deaçilaz (deacylase), kitinin, kitosan ve asetik asite hidrolizini katalizler. Çözünebilir kitosanın moleküler ağırlığı yüzbinlerce hatta iki milyon dalton kadar olabilir (Zikakis, 1998).

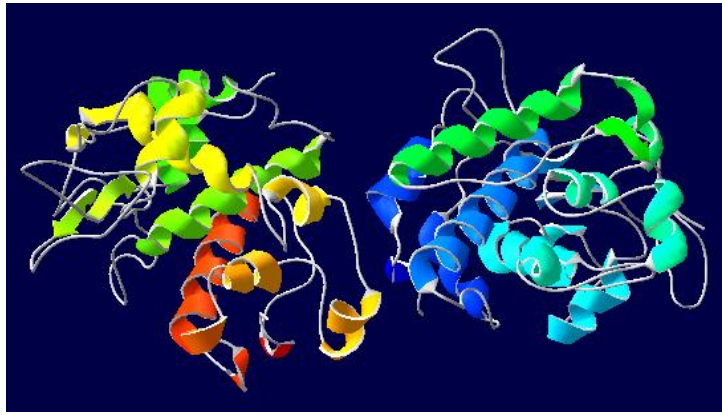


Şekil 1.1. Kitinin açık formülü

Kitinazlar organizmalar arasında oldukça yoğun bir dağılım gösterir. Bu dağılım bakteriler, mantarlar, yüksek bitkiler, böcekler, kabuklular ve bazı omurgalıları içermektedir (Jeuniaux, 1966; Flach ve ark., 1992). Kitinazların bu organizmalardaki rolleri çok çeşitlilik gösterir (Shubakov ve Kucheryavych, 2004).

Örn; mantar, kabuklu ve böceklerde organizmanın modifikasyonunu sağlar.

Bitkiler, mantarlara karşı savunma mekanizması olarak kitinaz üretirler. Kitinaz, fungal patojenlerin misellerini parçalar. Kitinaz geninin bitkilere transferi ile elde edilen transgenik bitkiler fungusid ve insektisid özellikler kazanmakta ve böyle transgenik bitkiler kendileri için patojen funguslarla ve böceklerle savaşabilmektedir. Doğal olarak genotipinde kitinaz geni bulunduran bazı bitkiler bilinmektedir. Örn; akçaağaç, siyah, kırmızı ve beyaz meşe ağaçlarının sağlıklı gövde ve kök dokularında β -1,3-glukanaz ve kitinaz varlığı tespit edilmiş ve bu enzimlerin bu ağaçlarda patojen olan *Armillaria mellea*'nin hif çeperlerinin erimesine sebep olduğu bildirilmiştir.



Şekil 1. 2. Kitinaz enziminin 3 boyutlu yapısı

Sağlam ve sert bir madde olarak böceklerin ve salyangoz gibi yumuşak canlıların dış iskeletini oluşturur. Her sene pek çok deniz canlısının evi ve sığınağı olan bu kabukların trilyonlarcası içlerindeki canlıların ölmesi sonucu okyanus ve deniz diplerine dolmaktadır. Bu ortamlardaki kitin parçalayıcı organizmalar sayesinde, önemli bir biyolojik arıtım olmaktadır. Özellikle *Vibrio furnisii* olarak isimlendirilen bakteriler deniz ve okyanuslarda en önemli kitin parçalayıcı bakteriler olarak görev yapmaktadırlar. Bu bakterilerin üretmiş olduğu kitinaz bir dizi kimyasal işlemten sonra kitini glikoz ve amonyak haline dönüştürürler. Kitinazlar yüksek organizasyonlu bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Bu enzim; domates, soya fasülyesi, buğday kepeği gibi bitkilerden izole edilmiştir ve

Streptomyces (özellikle *S. griseus*) *Serratia* ve *Aeromonas* türleri potansiyel üreticileridir. Kitinaz diğer karbohidrazilara benzer şekilde 3 enzim kompleksi ihtiva eder; bunlar; **endokitinaz, ekzokitinaz ve kitobiazdır** (Dubourdieu ve ark., 1985).

Ticari kitosanazlar fermentasyon yoluyla *Bacillus pumilis*'ten (Chitosanase BP [MJ]) üretilmiştir. Bu enzim glükozamin polimerlerini içeren mikroorganizmaların duvarını parçalama yeteneğindedir (mantarlar kitin duvar içerir) (McClery ve Matheson, 1987).

Bakteriler tarafından üretilen kitinaz ise, kitini karbon (C) ve enerji kaynağı olarak kullanma amacına yöneliktir (Roberts ve Selitrennikoffh, 1988; Goodey, 1990; Leah ve ark., 1995). Endokitinazlar, ekzokitinazlar, beta-N-Asetil-glükoaminidazlar ve kitobiazlar olarak sınıflandırılan kitinazların, kitin ve onun türevlerini parçaladıkları bilinmektedir. Endokitinazlar kitin polimerini içten parçalayarak ekzokitinazlar da kitobiozu bir uçtan salıvererek işlev görürler. Beta-N-asetil glükozaminidaz N-asetil glükoz amin monomerlerini kitinden çıkarır bu durumda kitobiaz da kitobiozu N-asetil glükozamine hidroliz eder. Kitinazlar birçok mikrobiyal türlerin bünyesinde barınmaktadır. *Serratia*, *Bacillus*, *Vibrio* türlerinin birçok kitinolitik enzim salgıladıkları ve kitin bağlayan protein ihtiva ederek bunların kitini sinerjistik olarak parçaladığı ve eksraselüler çevreye salgıladıkları bilinmektedir (Bassler ve ark., 1991; Tomassen ve ark., 1992; Watanabe ve ark., 1992; Suzuki ve ark., 1998). *Bacillus* türleri arasında kitinaz ve kitobiaz dağılımı incelenmiş ve *Bacillus licheniformis* 2X-70 suşunda termostabil kitinaz aktivitesi olduğunu saptamıştır (Rojas-Avelizapa ve ark., 1999). *Bacillus circulans* yaban tipi (wild type) 12 suşu kültür besi yeri içine kitinazı salgılama yeteneğindedir. Bakteri içerisinde teşvik edici subsrat olarak kitin ihtiva eden besi yerinde üretildiği zaman, 6 ayrı kitinaz enzimini salgılamakta ve enzim kültürün süpernatantından elde edilebilmektedir. Kitinaz A-1'in kitine karşı yüksek düzeyde affinitesi olduğu ve kitinaz sistemi içerisinde kitinazı parçalaması açısından önemli olduğu düşünülmektedir (Watanabe ve ark., 1992). *Bacillus circulans* 4.1 suşunun kitini yüksek pH'da (6-12.0) parçaladığı ve bu organizmadan kitinazın kısım kısım saflaştırılarak elde edildiği ve elde edilen kitinazın da güve larvaları üzerine toksik etkili olduğu saptanmıştır. *Bacillus thuringiensis*'in böcekler üzerindeki toksisitesi

kitinaz kodlayan gen tarafından artırılabilir (Rojas-Avelizapa ve ark., 1999).

Kitin ve proteinden zengin deniz ürünleri, pek çok ülkede büyük miktarlarda yenilebilir kaynakları oluşturmaktadır (Muzarelli ve ark., 1986). Meksika’da karides üretimi yılda 60.000-80.000 ton arasındadır, baş kısımları ve dış iskelet gibi yenmeyen atıklar bu miktarın yaklaşık %50-60’ını oluşturmaktadır. Onların kimyasal kompozisyonu (%27 Kitin, %40 protein ve %33 mineral içermektedir) ve yüksek düzeyde mevcudiyeti karides kalıntılarının, bazı ülkelerde kitosan/kitin üretimi için ham materyal olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Bu bileşiklerin eczacılık, gıda, tıp ve suların arıtılması gibi geniş bir alanda kullanılması söz konusudur (Muzarelli, 1977; Allans ve ark., 1984; Muzarelli ve ark., 1986; Uchida ve ark., 1989). Karides atıkları aynı zamanda kültür besiyerlerinde katkı maddesi olarak (Stephens ve ark., 1976) hayvansal besinlerin hazırlanmasında protein ve pigment ekstraksiyonu için (Oke ve ark., 1978), toprakta nematod popülasyonunun azaltılmasında (Brown ve ark., 1981), tek hücre proteini üretiminde (Revah-Moiseeu ve Carroad, 1981) ve enzim immobilisasyonunda (Chen ve Weng, 1983) kullanılmaktadır. Genelde kitin-protein içerikli atıklar biyoteknolojik prosesler için büyük bir potansiyeldir.

1. 2. *Bacillus*

Bacillus türü, aerob, sporlu çubuklar ailesinde bulunurlar ve genelde gram pozitif boyanırlar. Vejetatif formları düz, kenarları birbirine paralel, ucu yuvarlak veya küt biten, 0.5-1.2µm eninde 2.5-10µm boyunda basillerdir. Tek tek veya uzun zincirler şeklinde görülürler (Ustaçelebi, 1999). Türlerinin hepsi ısıya dayanıklı spor üretme yeteneğindedirler. Sporları silindirik, elipsoidal, küresel olabilir ve santral, subterminal veya terminal konumda bulunurlar. *Bacillus anthracis* dışındakilerin hepsi saprofitik ve genellikle patojenik değildir. Tipik olarak aerobiktirler fakat bazıları fakültatiftir. Mezofilik cinsler çoğunlukta olsa da zorunlu termofil, psikrofil, asidofil ve halofil cinslerde bulunur. Türlerin çoğunda hareket peritrik kamçıları tarafından sağlanır.

1.3. Enzimler

Enzimler, canlı organizmada oluşan tüm reaksiyonların hızlı bir şekilde koordine edilmesini sağlayan protein ana yapıya spesifik biyokatalizörlerdir. Tüm canlılarda bulunan bu enzimler hücrelerde gerçekleşen birçok biyokimyasal reaksiyonun katalizini canlı hücreye zarar vermeden ve hızlı bir şekilde gerçekleştirir. Enzimler metabolizmada yapım, yıkım, hidroliz, elektron aktarımı gibi olaylarda görev alırlar. Kimyasal katalizörlere kıyasla sahip oldukları katalitik güç, spesifiklik ve düzenlenebilirlik özelliklerinden dolayı da avantajlı moleküllerdir. Uygun koşulların sağlanması durumunda da enzimler in vitro olarak da katalitik etki gösterebildikleri için pek çok alanda da kullanılabilmektedirler.

Enzimler binlerce yıl öncesinden bu yana insanlığa hizmet etmiş olup ilk biyoteknolojik işlemler olarak kabul edilen ekmek, yoğurt, bira, şarap, peynir gibi ürünlerin hazırlanmasında bilinmeden kullanılmışlardır. Geçtiğimiz yüzyıldan itibaren ise enzim alanında yapılan çalışmalar arttırılmıştır. Spallanzani (1783) tarafından atmaca mide suyunun eti yumuşattığının bulunması, Kirchoff (1811)'un buğday nişastasının zamanla dekstirn ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi, Robiquet, Boutron ve Chaland (1830)'ın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini keşfetmeleri, Payen ve Persoz (1833)'un nişastayı şekere dönüştüren bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmeleri ve hücre dışı enzimatik aktivitenin varlığının anlaşılması enzimoloji alanında yapılan ilk temel çalışmalar olmuştur (Aehle, 2004).

Enzimler keşfedildikleri ilk yıllarda *ferment* olarak adlandırılmış olsa da ilk kez Berzelius (1838) enzimler için *katalizör (biyokatalizör)* ifadesini kullanmış ve ardından Kühne (1878) *enzim* terimini kullanan ilk kişi olmuştur. 1800'lü yılların sonuna doğru Emil Fischer enzimlerin substratlarına olan özgünlüklerini ortaya koyarak anahtar-kilit modelini tanımlamış ve bazı temel kavramların enzimoloji alanına girmesini sağlamıştır. Summer (1926)'ın kristalize formda üreaz enzimini ilk olarak elde etmesiyle enzim saflaştırma ve kristallendirme çalışmaları hız kazanmıştır. 1950 yılına dek pepsin, tripsin ve

kimotripsin gibi proteolitik enzimlerin bulunduğu pek çok enzim saflaştırılarak kristalize edilmiştir. Svedberg tarafından gerçekleştirilen ultrasantrifij tekniği ile enzimlerin molekül kütlelerine göre ayrımının yapılabileceğinin belirtilmesi, 1960 yılında rübonükleazın aminoasit dizisinin aydınlatılması, 1965 yılında lizozimin 3 boyutlu yapısının X-ışınları kristalografisi ile belirlenmesi enzimlerin kimyası ve yapısı alanındaki ilk çalışmalar olmuştur. 1950-1960 yılları arasında yapılan enzimolojik çalışmalardan enzimlerin yapısal esnekliği ile ilgili bilgiler ortaya çıkmış ve 1958 yılında Koshland, enzimlerin katalitik gücü ve özgünlüğünü açıklamak üzere indüklenmiş uyum (induced fit) modelini önermiştir. Aminoasit prekürsörlerinden ribonükleaz enziminin kimyasal olarak sentezi ilk kez Merrifield ve ark. (1969) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu alanda yapılan önemli bir gelişme olmamasına rağmen hazırlanan preparatın katalitik aktivitesi ve kimyasal saflığı oldukça düşük olmuştur.

Enzimler kullanım amaçlarına göre 3 grupta toplanabilir

1-Üretime yönelik çeşitli reaksiyonların katalizinde kullanılan saflık dereceleri düşük olan *endüstriyel enzimler*,

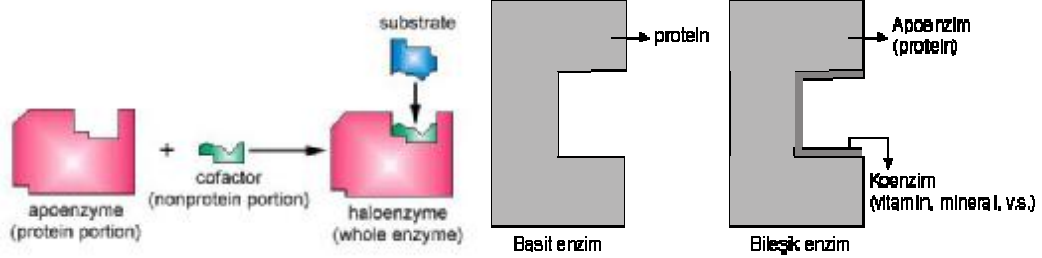
2-Bilimsel araştırma ve analitik amaçla kullanılan saflık dereceleri yüksek *analitik enzimler*,

3-Çeşitli fizyolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan ve saflık derecesi oldukça yüksek *klinik enzimler*.

1.3.1. Enzimlerin Yapısı

Enzimler kimyasal yapı bakımından protein ana yapılu moleküllerdir. Fakat bazı enzimlerde, proteine, protein olmayan daha küçük organik ve ya anorganik moleküllerin bağlanmasıyla oluşmuş *proteid* yapısı da söz konusudur. Enzimin sadece proteinden oluşmuş ve kofaktörleri içermeyen inaktif kısmına *apoenzim*, tüm kofaktörleri ve koenzimleri içeren katalitik aktif kısmına ise *haloenzim* denir. Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için gerekli olan, protein yapıda olmayan, genellikle metal iyonlarından (Fe^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} gibi) oluşan yan gruplarına *kofaktör* denir. *Koenzim* ise, enzimlerin aktivite gösterebilmek için

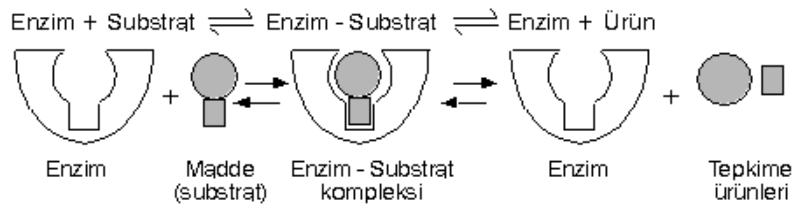
gereksinim duydukları kompleks organik moleküllerdir.



Şekil 1.3. Enzim-Substrat yapısı

Enzimlerin protein kısmı diğer doğal proteinlerde olduğu gibi 20 doğal amino asitin peptid bağlarıyla bağlanması sonucu oluşmuştur. Ancak çoğu enzimde, translasyon sonrası modifikasyonlar sonucu protein zincirinde yer alan amino asitlerin yan zincirlerinde (R-grupları) bazı kimyasal değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu durumda protein zincirine karbonhidrat, lipid, çeşitli organik moleküller ve ya metal iyonları bağlanmaktadır. Enzimlerin yapılarının aydınlatılmasında ilk adım *primer (birincil)* yapısının yani protein kısmının amino asit diziliş sırasının aydınlatılmasıdır. Doğal proteinlerin yapısına giren 20 amino asit mevcuttur ve bunlar birbirlerine kovalent olarak peptid bağları ile bağlanırlar. İkinci adım, polipeptid zincirinin yapıdaki amino asitlerin R grupları dikkate alınmaksızın uzaydaki konformasyonu yani *sekonder (ikincil)* yapının belirlenmesidir. İkincil yapının oluşumunda özellikle zincir içi ve zincirler arası oluşan hidrojen köprü bağları önemlidir. Üçüncü adım ise üç boyutlu yapının oluşumunda etkili rol oynayan *tersiyer (üçüncül)* yapının belirlenmesidir. Tersiyer yapı, zincirdeki aminoasitlerin R gruplarının da dikkate alınarak uzaydaki konumunun belirlenmesidir. Bu yapıyı belirleyen başlıca etmenler; hidrojen bağları, disülfid bağları, iyonik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimlerdir. Birden fazla alt birim (peptid zinciri)den oluşan enzimler de (oligomerik yapılı) dördüncü adım *kuarter (dördüncül)* yapının aydınlatılmasıdır. Dördüncül yapı, alt birimler arasındaki ilişki ve toplam molekülün uzaydaki konformasyonudur. Böyle bir enzimin alt birimleri

varyasyonu ile *izoenzimler* türer. İzoenzimler, *izozimler* olarak da adlandırılır ve aynı reaksiyonu katalizleyen, farklı birincil yapıya sahip, aynı organizmada oluşan iki ya da daha fazla enzimdir. Enzimlerin 3 boyutlu yapıları günümüzde x-ışınları kristalografisi ile ayrıntılı olarak aydınlatılabilmektedir. Bunun için öncelikle enzimin saf kristalize formuna ve primer yapı bilgisine ihtiyaç duyulur. Enzimlerin etki ettiği maddelere *substrat* denir. Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği bir merkez bulunur. Bu merkez *aktif merkez* olarak adlandırılır ve daima bir oluk ve ya yarık şeklindedir.



Şekil 1.4 Anahtar-Kilit Modeli

Aktif merkezde yer alan aminoasitlerin bir kısmı substratın buraya doğru olarak bağlanmasını sağlar. Bağlanmada etkin olan kuvvetler hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik etkileşimler ve kovalent bağlarıdır. Aktif merkezde substratın bağlandığı bir *bağlanma bölgesi* ve bir de katalitik dönüşüme uğratıldığı *katalitik aktivite* bölgesi bulunur (Yıldırım ve ark., 2007).

1.3.2. Enzimlerin Kod Numaralarına Göre Sınıflandırılması

1961 yılında enzim komisyonunun hazırladığı rapora göre enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre 6 ana sınıfa ayrılmış ve bu sınıflarda yer alan her enzim 4 rakamdan oluşan bir enzim kod numarası (EC no) ile ifade edilmiştir. EC numarasının ilk rakamı enzimin altı ana sınıftan hangisinde yer aldığını, ikinci rakam etki ettiği kimyasal yapı ve fonksiyonel grubu, üçüncü rakam alıcı grubu (akseptör) ve dördüncü rakam ise o serideki sıra numarasını ifade eder (Çizelge 1.1)

Çizelge 1.1 Enzimlerin kod numaralarına göre sınıflandırılması

1. Oksidoredüktazlar	Redoks reaksiyonlarını katalizlerler
1.1.	CH-OH grubuna etki edenler
1.2	C-O grubuna etki edenler
1.3	C-CH grubuna etki edenler
1.4	C-NH ₂ grubuna etki edenler
1.5	CH-NH grubuna etki edenler
2. Transferazlar	Fonksiyonel grupların transferinde görev yaparlar
2.1	C1- gruplarını transfer edenler
2.2	Karbonil gruplarını transfer edenler
2.3	Açıl gruplarını transfer edenler
2.4	Glikozil gruplarını transfer edenler
2.5	N- içeren grupları transfer edenler
2.6	Fosfat gruplarını transfer edenler
2.7	S- içeren grupları transfer edenler
3.Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler
3.1	Esterleri hidrolizleyenler
3.2	Glikozid bağlarını hidrolizleyenler
3.4	Peptid bağlarını hidrolizleyenler
3.5	Diğer C-N bağlarını hidrolizleyenler
3.6	Asit anhidridlerini hidrolizleyenler
4.Liyazlar	Çifte bağa katılma ve çifte bağın oluşum reaksiyonlarını katalizlerler
4.1	C-C liyazlar
4.2	C-O liyazlar
4.3	C-N liyazlar
5.İzomerazlar	İzomerleşme reaksiyonlarını katalizlerler
5.1	Rasemazlar
5.3	İntramoleküler oksidoredüktazlar
5.4	İntramoleküler transferazlar
6.Ligazlar	Sentez reaksiyonlarını katalizlerler
6.1	C-O bağını oluşturanlar
6.2	C-S bağını oluşturanlar
6.3	C-N bağını oluşturanlar
6.4	C-C bağını oluşturanlar

Çizelge 1.2 Enzimlerin Sınıflandırılması (John, 1987)

ENZİMLER	KAYNAKLAR
1. OKSIDOREDÜKTAZLAR	
Glukoz oksidaz	<i>Aspergillus niger</i>
Katalaz	<i>A. niger, Micrococcus lysodeictius</i>
Pironoz-2-oksidad	<i>Polyporus obtusus</i>
2. TRANSFERAZLAR	
3. HIDROLAZLAR	
Bacterial α -amilaz	<i>A. oryzae, A. niger</i>
Fungal α -amilaz	
Glukozamilaz	<i>A. niger, A. awemori, Endomycopsis sp., Rhizopus sp.</i>
B- gukonaz (licheninase)	<i>B. subtilis, B. amyloliquefaciens</i>
Selulaz kompleks	<i>Trichoderma reesei, A. niger</i>
α -1,3 glukonaz	<i>T. harzianum</i>
Dekstranaz	<i>Penicillium funiculosum</i>
Hemiselulaz	<i>B. subtilis, A. niger</i>
Pullunaoz	<i>Bacillus sp.</i>
α -galaktosidaz	<i>A. niger, Mortierella vinacea</i>
İnvertaz	<i>Maya</i>
Laktaz	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
Bacterial nötralproteaz	<i>B. amyloliquefaciens, B. subtilis</i>
Bacterial alkalın proteaz	<i>B. licheniformis, B. subtilis, B. amyloliquefaciens</i>
Fungal proteaz	<i>A. niger</i>
Rennet	<i>Mucor miehei, Mucor, Pusillus, Endothia parasitica</i>
Streptokinaz	<i>Streptococcus sp.</i>
I- aspangınaz	<i>Erwinia carotovara</i>
Urikaz	<i>B. fastidiosus</i>
Fungal pektınaz kompleks	<i>A. niger, Trichoderma reesei</i>
4. LİYAZLAR	
Fungal pektınaz kompleks	<i>Aspergillus niger</i>

5. İZOMERAZLAR	
Glukoz izomeraaz	<i>Bacillus coagulans, Actinoplanes missouriensis</i>
6. LİGAZLAR	

1.3.3. Enzimlerin Kullanım Alanları

Enzimlerin önemli bir uygulama alanı endüstrideki kullanımlarıdır. Çünkü, klasik kimyasal katalizörlere göre endüstriyel katalizörler olarak enzimler önemli bazı avantajlara sahiptirler (Goodenough ve ark., 1995).

- Yüksek düzeyde substrat özgünlüğü, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu elimine ederken materyal maliyetini düşürür ve çevre sorunu yaratmaz.
- Bazı stereoözümler rekasiyonlar enzimler olmadan gerçekleştirilemezler.
- Operasyon koşullarının ısıya duyarlı substratları bozma olasılığını azaltır ve operasyonun korozyon etkilerini ve enerji gereksinimlerini düşürür.
- Reaksiyon hızı yüksek ve maliyeti düşüktür.

Endüstriyel alanda kullanılan enzimlere örnek olarak proteolitik enzimler, amilolitik enzimler, glukoz izomeraazlar, pektolitik enzimler, selülaazlar ve galaktozidazlar verilebilir.

Enzimlerin diğler bir önemli uygulama alanları klinik amaçlı kullanımlarıdır. Medikal alandaki uygulamalara örnek olarak; genetik bozuklukların, dolaşım hastalıklarının, kanserin, sindirim yetmezliğinin tedavisi, yara temizliği ve tedavisi, ilaç tasarımı verilebilir. Bu amaçla amilaz, papain, pepsin, lipazı selülaaz, tripsin ve ribonükleaz gibi pek çok enzim kullanılmaktadır (Hebeda ve Hui, 1992).

Enzimler in vitro koşullarda da oldukça etkili katalizörler oldukları için genetik mühendisliğin de vazgeçilmezleridir. Bu alanda kullanılan enzimler,

hücrede DNA replikasyonu ve transkripsiyonu, istenmeyen ya da yabancı DNA moleküllerinin yıkımı, mutant DNA'nın onarımı ve rekombinasyon gibi çeşitli yaşamsal olaylarda önemli rol oynamaktadırlar. Genetik mühendisliğinde kullanılan enzimler başlıca 4 grup altında toplanırlar (Favaloro ve ark., 1980).

Nükleazlar: nükleik asit moleküllerini kesen, boylarını kısaltan ve ya parçalayan enzimlerdir. Bunlar ekzo- ve endonükleazlar, restriksiyon endonükleazlarıdır.

Ligazlar: nükleik asitleri birbirine bağlayan enzimlerdir. *E. coli* T4 ligazı gibi.

Polimerazlar: nükleik asitlerin kopyalarını hazırlayan enzimlerdir. *E. coli* DNA polimeraz I, reverse transkriptaz, terminal transferaz, termolabil DNA polimeraz gibi.

Modifikasyon enzimleri: kimyasal grupları ekleyen ya da ayıran enzimlerdir. Alkali fosfataz, polinükleotid kinaz gibi.

Çizelge 1.3 Enzim Kaynakları ve Kullanım Alanları (Madigan ve ark., 1997)

ENZİMLER	KAYNAK	KULLANILDIĞI YER	ENDÜSTRİSİ
Amilaz (nişastayı parçalar)	Mantar	Ekmek	Fırın
	Bakteri	Nişasta tabakası	Kağıt
	Mantar	Şurup ve glikoz	Yiyecek
	Bakteri	Düşük ısıda çamaşır kolalamada	Kolalama
	Mantar	Sindirime yardımcı ilaç	İlaç
	Bakteri	Kumaş tabakalarının uzaklaştırılması	Tekstil

	Bakteri	Lekelerin uzaklaştırılması, deterjanlar	Çamaşır
Proteaz(protein parçalayıcı)	Mantar	Ekmek	Fırın
	Bakteri	Leke uzaklaştırıcı	Kuru temizleme
	Bakteri	Yara temizleyici	İlaç
	Bakteri	Kumaş tabakalarının uzaklaştırılması	Tekstil
	Bakteri	Ev deterjanı	Çamaşır
	Bakteri	Etin yumuşatılması	Ei
Invertaz(sükroz parçalayıcı)	Bira mayası	Yumuşak şekerler	Şeker
Glukoz izomeraz	Bakteri	Yüksek fruktoz Mısır şurubu	Hafif içkiler
Glukoz oksidaz	Mantar	Glukoz uzaklaştırma	Yiyecek
		Oksijen uzaklaştırma	Yiyecek
		Diabetliler için ilaç	İlaç
Pektinaz	Mantar	Sıkıştırma saflaştırma	İçki, meyva suyu
Rennin	Mantar	Sütün koagülasyonu	Peynir
Selüloz	Bakteri	Kumaş yumuşatıcı, Parlaticı, deterjan	Deterjan
Lipaz	Mantar	Yağı parçalar	Süthane, çamaşırhane
Laktaz	Mantar	Laktozu, glukoz ve	Süthane, besinler

		galaktoza parçalar	
DNA polimeraz	Bakteri, Archaea	PCR ve DNA replikasyonu	Biyolojik araştırma, adli tıp

1.4. Elektroforez

Belli bir elektrik yüküne sahip biyomoleküllerin elektriksel bir alanda “sahip oldukları elektrik yüküne bağlı olarak” anod veya katoda göç etmeleri prensibine elektroforez denir (Vesterberg, 1993).

Moleküllerin elektriksel alanda göç etmeleri moleküler ağırlık, moleküler konformasyon, ortamın pH’sı, kullanılan ayırma ortamının por çapı, sıcaklık, elektroforez zamanı, uygulanan akım şiddeti gibi çok farklı parametrelerden etkilenmektedir (Maniatis ve ark., 1982; Walker ve ark., 1988).

Biyolojik materyallerin separasyonu, determinasyonu, moleküler ağırlıklarının saptanması ve farklı özelliklerin ortaya konması amacıyla, **SDS-PAGE** (sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel), **IEF** (Isoelectric-focusing), **Agaroz jel elektroforezi** (agarose gel), **kapiller jel elektroforezi** (capillary gel electrophoresis), Gradient-PAGE, Pulsed-Field jel elektroforezi gibi çok farklı elektroforez uygulaması vardır (Gaal ve ark., 1980; Jeyaseelan ve ark., 1987; Temizkan ve Arda, 2008).

1.4.1. SDS-PAGE Sistemi

Akrilamidin polimerizasyonuyla hazırlanan poliakrilamid jellerin elektroforetik ayrımlarda çeşitli üstünlükleri vardır: küçük ya da orta boydaki ($\approx 1 \times 10^6$ Da’a kadar) nükleik asitler ve proteinler için yüksek ayırıştırma gücüne sahiptir; oldukça büyük boyuttaki örnekler için uygundur; göç eden moleküllerle ayırma ortamı arasındaki etkileşim en düşük düzeydedir; ayırma ortamı fiziksel olarak oldukça kararlı ve dayanıklıdır.

Poliakrilamid jellerle yapılan elektroforez, örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrılmalarına yol açar, çünkü ayırım hem moleküler elekleme hem de elektroforetik harekete dayanır. PAGE'in, jel geçirgenlik kromatografisinden farkı, poliakrilamid jelde küçük moleküllerin büyük moleküllerden daha hızlı hareket etmeleridir (Sambrock ve ark., 1988; Bonnie, 1990).

Poliakrilamid jeller akrilamid ve çapraz bağlayıcı N,N'-metilen-bis-akrilamidin serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanır. Kimyasal polimerizasyon bir başlatıcı-katalizör sistemi (AMPS-TEMED) tarafından gerçekleştirilir. Fotokimyasal polimerizasyon, UV ışını ve riboflavin kullanılarak gerçekleştirilir.

SDS anyonik bir deterjandır ve proteinlere sıkıca bağlanarak denatüre eder ve molekülün negatif yükünü artırır. Protein molekülleri negatif yüklü olduğundan SDS-protein kompleksleri elektroforez ortamında anoda doğru göç eder. Ayrıca biyomoleküllerin çoğu negatif yüklü olduğundan elektroforez sırasında anoda doğru hareket ederler bu yüzden elektroforez genellikle bazik pH'da (8.0-8.3) gerçekleştirilir. Analiz edilecek örnek, bir izleme boyası ile (Brom-Phenol Blue) birlikte jelin üst kısmında oluşturulan kuyucuklara uygulanır ve sistemden elektrik akımı geçirilir. Örnekteki bileşenlerden daha hızlı hareket eden izleme boyası jelin bitimine ulaştığında akım kesilir, jel protein boyama karakterindeki bir boya ile (Coomassie-Brilliant-Blue R 250, G-250, Silver Stain vb) boyanır. Moleküler ağırlık hesaplamaları yapılacak uygulamalarda jeldeki kuyucuklardan birine marker protein uygulanır. Marker proteinin jelde göç ettiği mesafe, örnekler ile kıyaslanarak moleküler ağırlık Da veya kDa olarak saptanır (Temizkan ve Arda, 2008).

1.5. Plazmid Curing (Plazmid Eliminasyonu)

Bakterilerde kromozomdan başka, genom DNA'sından bağımsız replikasyon yapabilen, genellikle halkasal, çift iplikli olan DNA moleküllerine plazmid denir. Plazmidler bakterinin üremesi için gerekli olan temel genleri taşımazlar. Buna karşılık bakteriye uygun olmayan ortam koşullarında

yaşayabilme, çeşitli toksik maddeler üretme ve metabolize edebilme, antibiyotiklere dirençlilik ve antibiyotik sentezini gerçekleştirebilme, patojenlik özelliği kazandırma gibi özellikleri sağlayan genleri taşırlar.

Plazmid eliminasyonu herhangi bir karakterin plazmid tarafından kodlandığını göstermenin en iyi yoludur. Şöyleki; saf halde izole edilmiş bakteri kültürü antibiyotik dirençliliği gösteriyorsa bu dirençlilik geninin plazmid üzerinde taşınma ihtimali vardır. Plazmid eliminasyon testine maruz bırakılmış bakteri kültüründen, dirençliliğini kaybeden (antibiyotiğe hassas hale gelen) suşların seçilmesi mümkün olabilmektedir. Böylelikle belirlenen bir özelliğe ait gen plazmid üzerinde ise plazmid DNAsı bakteriden kolaylıkla izole edilebilir.

Plazmid eliminasyonu amacı ile sıcaklık, SDS ve intercalating boyaları (ethidium bromid, akridin orange gibi) kullanılabilir (Hardy, 1993).

AMAÇ

Doğal ortamlardan (özellikle kitin ihtiva eden çevrelerden), kitinaz üretme yeteneğinde olan mikroorganizmaların (*Bacillus* türleri) izolasyonu, saf kültürlerinin hazırlanması, identifikasyonu, en yüksek kitinaz üretme yeteneğinde olan suştan üretilcek kitinaz enziminin karakterizasyonu amaçlanmıştır. Enzim karakterizasyonu için; optimum pH, optimum sıcaklık, pH ve sıcaklık stabilite tayinleri, SDS-PAGE’de enzimin separasyonu, çeşitli inhibitör ve aktivatörlerin enzim aktivitesi üzerine olan etkileri araştırılacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Shubakov ve Kucheryavykh, (2003), 9 filamentöz mantar türü ve cinsi ile kitinolitik aktiviteleri konusunda çalışmışlardır. Bunlar; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Sporotrichium*, *Beaureia* ve *Mucor*'dur. Bu mantar suşları %1 kitin içeren sıvı besiyerlerinde üretildiği zaman 0,2 U/mg (*Sporotrichium olivaceum*, *Mucor sp*) ile 4,0-4,2 U/mg (*Trichoderma lignorum*, *Aspergillus niger*) oranında değişen aktivite gösteren ekstraselüler kitosan suşlarıdır.

Lee ve ark. (2006), *Bacillus sp.* DAU101'e ait kitinaz genini *E.coli*'ye klonlamışlardır. Kitinazın optimum pH'sı 7,5 ve optimum sıcaklığı 60 °C olarak saptanmıştır. Zn^{+2} , Cu^{+2} , ve Hg^{+2} metal iyonları, kitinaz aktivitesini kuvvetli biçimde inhibe etmiştir. Fakat kitinaz aktivitesi Co^{+2} ile 1,4 kat artmıştır. Enzim, glikol kitin, glikol kitosan veya CMC hidroliz edemediği halde koloidal kitin veya çözülebilir kitosani hidrolize etmiştir.

Yuli ve ark, (2004), Endonezyanın Tompasso sıcak su kaynağından kitinaz üreten bir bakteri izole etmişlerdir. 16SRNA sekans analizine göre; bu Gr(+), spor üreten, çubuk şekilli, bakteri *Bacillus sp.* 13.26 olarak adlandırılmıştır. Bakteri %5'lik kitin içeren besiyerinde 72 saat 55 °C'de üretildiğinde ekstrasellüler kitinaz üretmiştir. Enzimi NH_4SO_4 (amonyum sülfat) yöntemi ile saflaştırmışlar ve saf enzim moleküler ağırlığı SDS-PAGE'de 60 kDa saptanmıştır. Optimum sıcaklık 60°C ve optimum pH 7.8 olarak bulunmuştur. 70 °C 5 saat ön inkübasyondan sonra kitinaz aktivitesi korunmuştur. Zimogram analizleri ile de enzimin termal stabilitesi doğrulanmıştır. 80 °C'de 1 saatlik inkübasyondan sonra enzim önemli derecede korunmuştur.

Vaidya ve ark. (2003), *Alcaligenes xylosoxydans*'tan kitinaz elde etmişler ve. SDS-PAGE ve gel filtrasyon tekniği ile enzimin moleküler ağırlığını yaklaşık 44-45 kDa olarak saptamışlardır. Enzim 50 °C'de ve pH 5'te optimum aktivite göstermiştir. PAGE'de tek bant görülmüştür. Kitinin K_m değeri $3 g^{-1}$ bulunmuş. 5mM Cu^{+2} ve Na^+ kitinaz aktivitesini %25 inhibe ederken aynı konsatrasyonlarda Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Ba^{+2} etki etmemiştir. Saflaştırılan enzim *Aspergillus niger* misellerini parçalamıştır.

Ramirez ve ark. (2003), kitinaz aktivitesini arttırmayı amaçlayan, Remazol Brilliant Blue R® ile boyanmış kolloidal kitinin kullanımına bağlı, kitinaz aktivitesini arttırmayı amaçlayan basit ve duyarlı bir metod kullanmışlardır. Bu teknikle, işaretlenmiş kolloidal kitin, sıvı besiyerinde karbon kaynağı olarak bulunuyorsa, kitinolitik mikroorganizmaların seleksiyonunu ve karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Kolloidal substrat orantılı olarak çözünmüş ve boyayı serbest bırakmıştır ve spektrofotometrede 595 nm de ölçülmüştür. Bu çalışmada RBB'nin kolloidal kitini boyaması ve fiksasyonu için kullanılan prosedürler ve ticari chitin-azure substratı ile kıyaslanması gösterilmiştir. Boyaların serbest bırakılması sırasında ki bazı fizikokimyasal ve enzimatik parametrenin etkisinde ayrıca gösterilmiştir. Her iki boyanmış substratta pH, substrat konsantrasyonu, ısı ve zamanın *Bacillus thuringiensis* BT-107'deki kitinaz reaksiyonuna etkisini incelemek için kullanılmıştır.

Gohel ve ark. (2004), kitinaz aktivitesini göstermek için poliakrilamid jel elektroforezinden sonra kitin agarda kitinaz aktivitesi metodunu tanımlamışlardır. Calcofluor white M2R, fluorescein isothiocyanate, rhodamine B, ruthenium red ve congo red gibi farklı boyalar kitin agarda birlikte kullanılmıştır. Poliakrilamid jel elektroforezinden sonra jel farklı boyalar içeren kitin agara transfer edilmiştir. 0.2 M pH 5.0 olan asetat buffer, ince bir tabaka şeklinde jelden plağa difüzyonunu kolaylaştırmak için dökülmüştür. 7 saatlik inkübasyondan sonra kitinaz bantları gün ışığı yada UV de görünür hale gelmiştir. 0.5 ünitelik kitinaz birimlerini bile ayırt edebildiği için metod çok duyarlıdır. Böylelikle yöntem, duyarlı, hızlı, kullanışlı, güvenli ve ekonomik olarak tanımlanmıştır.

Dahiya ve ark. (2005), *Enterobacter sp.* NRG4'ü kitin içeren ortamda üretildiğinde, kitinaz salgıladığını göstermişlerdir. 60 kDa molekül ağırlığındaki ekstraselüler kitinaz, karakterizasyon ve homojenizasyon için saflaştırılmıştır. Enzim şişmiş kitini, kolloidal kitini ve glikol kitini hidrolize etmiştir, fakat kitozanı hidrolize edememiştir. Enzim Km ve Vmax için şişmiş kitinde 1.43 mg/ml ve 83.33 µM/µg inhibe etmiştir. Bu değerler kolloidal kitin için 1.8 ve 40 mg/ml, glikol kitin için 2.0 mg/ml ve 33.33 µM/µg dür. Optimum sıcaklık ve pH; 45°C ve pH 5.5 dir. Mg⁺², K⁺ ve Ca⁺², %13, %16 ve %18 oranında kitinaz aktivitesini stimüle ederken

Cu^{+2} , Co^{+2} , Ag^{+} ve Hg^{+2} kitinaz aktivitesini % 9.7, %15, %22 ve %72.2 oranında inhibe etmektedir (1 mM konsantrasyonlarında). 1 mM N-bromosuccinamide (NBS) ve 10 mM iodoasetamit, enzimi tamamen inhibe etmektedir. 10 mM dithiobisnitrobenzoic asit (DNTB) enzimi % 97.2 oranında inhibe etmektedir. Kitin saf enzimle inkübe edildiğinde, kitobioz ve N-asetil D-glukozamine hidrolize olmaktadır. Saflaştırılmış enzimin hidroliz yolu kitinazın bir endokitinaz olduğunu göstermiştir.

Yalpani ve Pantaleone (2001), Kitozan, kitin, suda çözünabilir kitin, kitin azure ve α -(1→4)-poly(galactosamine) içeren aminoglikanların bir seri ticari enzim preparatlarına duyarlılıklarını incelenmiştir. Beklenmedik şekilde çok sayıda enzim preparasyonları aminoglikan hidrolizi vermiştir. Dikkat çekecek derecede bu enzim preparasyonlarının bir kaçı kitozana karşı kitinaz ve lizozim gibi katalistlerle kurulmuş kitozonolitik aktivitelerle ona eş ya da onu baskılayan litik aktivite göstermiştir. Böylelikle doza yanıt profillerinden temellenerek birkaç proteaz pepsin, bromelain, ficin ve pankreatin gibi kitozan hidrolizi ve lizozim preparasyonu için ticari kitinazlara göre daha yeterli katalist olmuştur. Selüloz, hemiselüloz, lipaz ve proteaz için kanıt ise genel litik ajan yokluğunu akla getirmektedir. Böylelikle bu enzim preparasyonlarının kendi optimum sıcaklık ve pH larında litik aktivitelerinin farklı profilleri incelendiğinde substrat konsantrasyonlarına, substrat N-asetilasyon derecelerine, moleküler ağırlık fraksiyonlarına hassasiyetleri gözlenmiştir. Benzer şekilde kitozan solusyonları iki eş zamanlı enzime tabi tutulduğunda birkaç enzim için hidrolitik yeterlilikte farklılıklar ortaya çıkmıştır. Kitozan hidrolizi aynı zamanda insan salyası ile yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. pH 3 de 40 °C 'de papain ve hemiselüloz preparasyonlarında kitozan hidrolizi meydana gelmiştir. Sonuçlar, maliyeti az enzimlerle kitozanın, kitinin ve diğer aminoglikanların hidrolize edilebilirliğini göstermektedir.

Bhushan ve Hoondal (1999), *Bacillus* sp. BG-11'den saflaştırılmış, termostabil kitinaz aktivitesinin %90'nını Aromex, Captafol, Captan, Chlorothalonil, Dinocap, Metalaxyl, Sulphur, Triadimefon, gibi fungusit, Acephate, Chloropyriphos, Cypermethrin, Diclovorus, Dimethoate, Methomyl, Malathion, Methylparathion ve

Monocrotophos gibi insektisit varlığında litrede 100 µg enzim konsantrasyonunda aktivitesini korumuştur. Allosamidin kitinazı IC₅₀ ve 48 µM da inhibe etmiştir.

Frankowski ve ark. (2001), kitinolitik rizobakter *Serretia plymuthica* HRO-C48 daha önceden fitopatojenik fungi ajanı olarak seçmiştir. Bir endokitinaz (E.C. 3.2.1.14), CHIT60 ve bir N-asetil-β-1,4-D-heksozaminidaz (E.C. 3.2.1.52), CHIT100, saflaştırılmıştır ve tanımlanmıştır. 60.5 kDa ağırlıklı endokitinaz CHIT60 bir N-terminal aminoasit sekansına sahiptir ve buda *Serretia liquefaciens* ve *Serratia marcescens*'den elde edilenlere benzerlik gösterir. Enzim aktivitesi 55 °C de, pH 5.4'de pik yapar ve 10 µM Co⁺² veya Mn⁺² varlığında %20'lik artış gösterir. Aktivite, 10 µM Cu⁺² varlığında %80 inhibe olur. CHIT100 95.6 kDa ağırlığında 6.8 ???pI ile monomerik enzim görünümündedir. Optimal aktivitesi 43 °C de pH 6.6'dadır ve ortamda 10 µM Co+2 veya Cu+2 varlığında aktivitesi %90 artış gösterir. CHIT 100 (100µg/ml) *Botrytis cinerea* da spor çimlenmesini % 28 ve çimlenme tüpü uzamasını %31.6 oranında inhibe eder. 100µg/ml de CHIT 60 da ise etki daha fazladır. 100 mikrogram/ litre ile çimlenmeyi %78 ve çimlenme tüpü uzamasını %63.9 oranında inhibe eder.

Steijn ve ark (2002), İnsan salyasındaki kitinazı incelemişlerdir. Kitin, içeren oral patojenlere karşı savunma rolü gösterebilir. Periodontitis hastalarındaki kitinazın aktivite seviyesi kontrol grubundan önemli derecede yüksek çıkmıştır. 5-6 aylık periodontal tedavi süresi boyunca bu enzimin aktivitesinde 3-4 katlık artış görülmüştür. β-N asetilheksozaminidaz daha az olsada aktivitesi artan bir diğer glikozidik bağları hidrolize eden enzimdir. Kitinaz aktivitesindeki artış ile problemadaki kanama ve kayıplardaki artışlar arasında bağ yoktur ve problema paket derinliği ve plak indeksi arasında zayıf bir bağ gözlenmiştir. Yukarıdaki klinik parametrelerle β-N-asetilheksozaminidaz aktivitesi arasında bağlantı bulunamamıştır.

Perrakis ve ark., 1994, tütünde yeni bir tip kitinazı, çinko affinite kolonu kullanarak saflaştırılmıştır ve sonradan klonlanmıştır.

Bhushan, (2000), bir alkalofilik, çevrede yaygın bulunabilen mikroorganizma olan *Bacillus sp.* BG-11 izole etmiş ve tanımlamıştır. Bakteri kitince zenginleştirilmiş ortamda, 50 °C de 72 saatlik, sıvı batch fermentasyonda 76 U ml ml⁻¹ kitinaz üretmiştir. Saflaştırılmış kitinin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile

yaklaşık olarak 41 kDa olarak saptanmıştır. Hareketsiz(immobilized) kitinazın, kitozan ve kalsiyum alginatdaki optimum pH'sı 8,5 ve optimum sıcaklığı 50 °C'dır ve bu serbest enzimle aynıdır. Hareketsiz kitinazın pH ve termostabilitesi önemli derecede artmıştır. Kitozondaki hareketsiz kitinaz pH 5 - 10 arasında stabildir ve kitozon- hareketsiz enzimin yarı ömrü 70, 80 ve 90 °C ve sırasıyla 90, 70 ve 60 dakikadır. Enzim-substrat reaksiyonu sonucunda oluşan son ürün ¹³C- formu ile tanımlanmıştır ve N-asetil-D-glukozamin en büyük son ürün olarak bulunmuştur. GlcNAc (GlcNAc)₂, ve GlcNAc₃ kitinaz aktivitesini 10 mmol l⁻¹ konsantrasyonda sırayla % 32, 25 ve 18 oranlarında engellemiştir. KCl, sodyum metabisülfid, sodyum azid varlığında 4°C'de kitinazın raf ömrü 8 haftadır. Enzim proteaz ve allosamidine dirençlidir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu araştırmada kullanılan *Bacillus* suşları doğal ortamlardan izole edilmiştir. Besiyerleri, çeşitli tamponlar, kimyasallar, shaker, santrifüj, spektrofotometre, elektroforez sistemleri ve diğer ekipmanlar kullanılmıştır.

3.1.1. Bakterilerin Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri

3.1.1.1. Kitinli LB Besiyeri (Luria-Bertoni Broth)

Kitinaz enzimi üretmek için ilk kültürün (aşılama amacıyla 24 h'lık kültür) hazırlanması aşamasında kullanılmıştır (Gerhardt ve ark., 1994; Wen ve ark., 2002).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Maya	5
Trypton	10
NaCl	5
<u>Koloidal Kitin</u>	<u>10</u>

1M NaOH ile pH=7.0'a ayarlanmış, otoklavda 121 °C'de, 1.2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.2. Jeloz Besiyeri

Bacillus suşlarının ilk izolasyon aşamalarında ve stok kültürlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır (MacFaddin, 2000).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Pepton	10
Et Özütü	10
NaCl	5
<u>Agar</u>	<u>14</u>

pH=7.0'a ayarlanmış, otoklavda 121 °C'de, 1.2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.3. N1 Besiyeri

Saf kültür olarak seçilmiş bakteri suşlarının çoğaltılması amacıyla kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Pepton	10
Et Özütü	10
Maya	5
Glikoz	1
<u>Agar</u>	<u>15</u>

pH=7.0'a ayarlanmış, otoklavda 121 °C'de, 1.2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.4. CHDA Agar (Chitinase-detection agar)

Doğal ortamdan izole edilen bakteri suşlarında kitinaz aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır (Wen ve ark., 2002). M9 besiyerine 20 g agar ve 10 g koloidal kitin ilave edilerek hazırlanmıştır.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Na ₂ HPO ₄	0.65
KH ₂ PO ₄	1.5
NaCl	0.25
NH ₄ Cl	0.5
MgSO ₄	0.12
CaCl ₂	0.005
Koloidal kitin	10
<u>Agar</u>	<u>20</u>

pH= 6.5' e ayarlanmış, otoklavda 121 °C'de, 1.2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.5. Üre Agar

Kitinaz üretme yeteneği yüksek olan suşların identifikasyonu amacıyla, biyokimyasal testlerden, ürenin hidroliz testi için kullanılmıştır (MacFaddin, 2000).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Pepton	1
NaCl	5
Üre	20
KH ₂ PO ₄	9.1
Glikoz	1
Fenol Kırmızısı	0.012
<u>Agar</u>	<u>15</u>

pH=7.0'a ayarlanmış, otoklavda 121 °C'de, 1.2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.6. Simon's Sitrat Agar

Karbon kaynağı olarak sitratın kullanıldığını saptamak için kullanılmıştır (MacFaddin, 2000).

Bileşimi	g/L
NaCl	5
MgSO ₄	0.2
NH ₄ H ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	2
Bromtimol mavisi	0.08
<u>Agar agar</u>	<u>20</u>

pH=7.0'a ayarlanmış, otoklavda 121 °C'de, 1.2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.7. Jelatin Besiyeri

Jelatinin hidrolizini gözlemlemek amacıyla kullanılmıştır (MacFaddin, 2000).

Bileşimi	g/L
Pepton	10
Et özütü	10
NaCl	5
<u>Jelatin</u>	<u>120</u>

3.1.1.8. Yumurtalı Agar (Egg Yolk Agar)

Bakterilerin tanılanmasında lesitinaz (lecithinase) testi için kullanılmıştır. Bu test; mikroorganizmanın lesitinaz üretme yeteneğini saptamak için, yumurta sarısını opak hale getirmesi prensibine dayanır (Hayward, 1941; McClung ve Toabe, 1947).

Yumurta sarısındaki lipoprotein (lesitin) lesitinaz tarafından hidrolize edilerek choline ve fosfor serbest kalır. Çözünmeyen yağlar (digliseridler) presipite olarak koloni etrafında opak bir hale oluşur (Baron ve Finegold, 1990).

Bir adet yumurta, steril su ile yıkanmış, etil alkolde 3 saat bekletilmiş ve alevden geçirildikten sonra, sarısı ayrıştırılarak serum fizyolojik (SF) ile homojenize edilmiştir. Elde edilen emülsiyondan, steril edildikten sonra 50 °C'ye soğutulmuş jelöz besiyerine %10 oranında ilave edilerek hazırlanmıştır (MacFaddin, 2000).

3.1.1.9. Clark-Lubs Besiyeri (Methyl Red/Voges Proskauer Broth, MR/VP Broth)

Metil kırmızısı (MR) ve Voges Proskauer (VP) testleri için kullanılmıştır (Clark ve Lubs, 1915). Bu test; glikoz fermantasyonu ürünlerinin dolaylı olarak gösterilmesi esasına dayanır (Davis, 1990).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Pepton	7
K ₂ HPO ₄	5
<u>Glikoz</u>	<u>5</u>

pH=6.9'a ayarlanmış, otoklavda 121 °C'de, 1.2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.10. İndol Besiyeri (Tryptophan/Peptone Broth)

Triptofandan indol açığa çıkarma yeteneğini belirlemek amacıyla kullanılır. İndolun belirlenmesinde, pepton, kazein pankreatik parçalanmış formu ve enzimatik kazein hidrolizat yeterli düzeyde triptofan içermektedir (Müller, 1986; Baron ve ark., 1990). Bunlardan herhangi biri besiyerinde kullanılabilir.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Kazein peptonu	10
NaCl	5
<u>Triptofan</u>	<u>10</u>

pH=7.0'a ayarlanmış, otoklavda 121 °C'de, 1.2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.11. Nişasta Besiyeri

Nişastanın enzimatik hidrolizini saptamak amacıyla kullanılmıştır. Hidroliz *iyod* çözeltisi kullanılarak gözlemlenir (Cantarow ve Schepartz, 1962; Cowan, 1974).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Pepton	5
Et özütü	3
NaCl	5
Çözünür nişasta	20
<u>Agar</u>	<u>20</u>

pH=7.2'e ayarlanmış, otoklavda 121 °C'de, 1.2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.12. Kanlı Agar

Bu besiyeri organizmanın hemolizin üretme yeteneğini test etmek amacıyla kullanılmıştır. Jelöz besiyerine %10 oranında EDTA'lı (antikoagülan) insan kanı ilave edilerek hazırlanmıştır. Kan, jelöz besiyeri steril edilip 50 °C'ye soğutulduktan sonra ilave edilmiştir (Darling, 1975; Phillips ve ark., 1980).

α -hemolizin (α -toksin) veya β -hemolizin (β -toksin) üretme yeteneği *Bacillus* tanısında önemli bir parametredir (Murpy ve ark., 1952).

3.1.2. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

3.1.2.1. Lugol çözeltisi

Nişastanın enzimatik hidrolizini gözlemlemek amacıyla kullanılmıştır (Çetin, 1968).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/100 mL</u>
İyot	7
Potasyum İyodür	3

Hazırlanan çözelti renkli şişede saklanmış, kullanılmadan önce 1:20 oranında sulandırılmıştır.

3.1.2.2. Sitrat Tamponu, (Temizkan ve Arda, 2008).

Kitinazın pH 4.0-5.5 aralığında aktivitesini saptamak için kullanılmıştır. Bu tamponu hazırlamak için;

0.2 M Sitrik Asit ve 0.2 M Na₂HPO₄·7H₂O çözeltileri ve distile su uygun oranlarda karıştırılır ve istenilen pH değerinde yeni bir tampon elde edilir. pH aralıklarına uygun karışımlar Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Sitrik Asit Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması.

pH	0.2 M Sitrik Asit (19.21 g/L) [mL]	0.2 M Na ₂ HPO ₄ (53.65 g/L) [mL]	Distile Su [mL]
4.0	30.7	19.3	50
4.5	26.7	23.3	50
5.0	24.3	25.7	50
5.5	21.0	29.0	50

3.1.2.3. Sodyum-Fosfat Tamponu, (Temizkan ve Arda, 2008).

pH: **6.0-8.0** aralığında enzim aktivitesinin saptanması için kullanılmıştır.

0.2 M NaH₂PO₄, 0.2 M Na₂HPO₄·7H₂O ve distile su uygun oranlarda karıştırılarak, istenilen pH aralığında tamponlar elde edilmiştir. Bu oranlar çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Sodyum-Fosfat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması.

pH	0.2 M NaH ₂ PO ₄ (27.8 g/L) [mL]	0.2 M Na ₂ HPO ₄ (53.65 g/L) [mL]	Distile Su [mL]
6.0	87.7	12.3	100
6.5	68.5	31.5	100
7.0	39.0	61.0	100
7.5	16.0	84.0	100
8.0	5.3	94.7	100

3.1.2.4. Glisin-NaOH Tamponu, (Temizkan ve Arda, 2008).

pH **8.5-10.5** aralığında enzim aktivitesinin saptanması için kullanılmıştır.

0.2 M Glisin, 0.2 M NaOH ve distile su uygun oranlarda karıştırılarak, istenilen pH aralığında tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Bu oranlar çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Glisin-NaOH Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması.

pH	0.2 M Glisin (15.01 g/L) [mL]	0.2 M NaOH (8 g/L) [mL]	Distile Su [mL]
8.5	4.0	50	146
9.0	8.8	50	141.2
9.5	22.4	50	127.6
10.0	32.0	50	118
10.5	45.5	50	104.5

3.1.2.5. Borax-NaOH Tamponu, (Temizkan ve Arda, 2008).

pH: **11.0-12.5** aralığında enzim aktivite düzeylerinin saptanması için kullanılmıştır.

0.05 M Boraks (19.05 g/L) ve 0.2 M NaOH (veya yüksek pH aralıkları için 2 N NaOH) çözeltileri hazırlanır. 0.05 M Boraks çözeltisinden 50 mL alınarak üzerine istenilen pH değeri elde edilinceye kadar uygun NaOH çözeltisi ilave edilir, son hacim distile su ile 200 mL'ye tamamlanır.

3.1.2.6 Chitin-azure

Kitinaz aktivitesinin spektrofotometrik yöntemle tayin edilmesi için kullanılmıştır (Shih ve McDonald, 1997; Ramirez ve ark., 2003).

Hazırlanması

Chitin azure (Fluka, Sigma) 100 mg

50 mM Fosfat Tamponu (pH: 6.5) 50 mL

Hazırlanan çözelti renkli şişede +4 °C'de saklanmıştır.

3.1.3. Elektroforez Uygulamalarında Kullanılan Çözeltiler**3.1.3.1. Solüsyon-A: (Akrilamid Stok Solusyonu)**

%30 w/v akrilamid ve %0.8 w/v bisakrilamid (Dunbar, 1990; Bollag ve ark., 1996).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/100 mL</u>
Acrylamide	29.2
Bis-acrylamide	0.8

Distile su ilave edildikten sonra akrilamid tamamen çözününceye kadar magnetik karıştırıcıda karıştırılır. Çözelti hazırlanırken çeker ocakta çalışmak ve akrilamid bulunan şişenin ağzının parafilm ile kapalı olmasına dikkat etmek gerekir.

Çözelti +4 °C'de aylarca saklanabilir.

Not: Polimerize olmamış akrilamid deriyi irrite edici ve nörotoksik özelliğindedir. Daima eldivenle çalışmak gerekir.

3.1.3.2. Solüsyon-B (4X Separating Jel Tamponu), (Dunbar, 1990; Bollag ve ark., 1996).

<u>Bileşimi</u>	<u>mL/100 mL (v/v)</u>	
2M Tris-HCl (pH=8.8)	75	(1.5 M)
%10 SDS	4	(%0.4)
<u>H₂O</u>	<u>21</u>	

Bu çözelti buzdolabında aylarca stabil kalabilir.

Not: Native jel uygulamalarında SDS kullanılmadığı için distile su 25 mL ilave edilir.

3.1.3.3. Solüsyon-C (4X Stacking Jel Tamponu), (Dunbar, 1990; Bollag ve ark., 1996).

<u>Bileşimi</u>	<u>mL/100 mL (v/v)</u>	
1 M Tris-HCl (pH=6.8)	50	(0.5 M)
%10 SDS	4	(%0.4)
<u>H₂O</u>	<u>46</u>	

Buzdolabında aylarca saklanabilir.

3.1.3.4. AMPS (%10 Amonyumpersulfat), (Dunbar, 1990; Bollag ve ark., 1996). Polimerizasyonu başlatıcı olarak kullanılır.

Bileşimi	g/100 mL (w/v)
-----------------	-----------------------

Amonyum persülfat	10
-------------------	----

Distile su	100 mL
------------	--------

Kapaklı renkli şişede buzdolabında saklanmalı ve taze hazırlanmalıdır.

3.1.3.5. Elektroforez Tamponu, (Dunbar 1990; Bollag ve ark., 1996).

Bileşimi	g/L (w/v)
-----------------	------------------

Tris	3 (25 mM)
------	-----------

Glycine	14.4 (192 mM)
---------	---------------

SDS	1 (% 0.1)
-----	-----------

H ₂ O	1000 mL
------------------	---------

pH=8.3, oda sıcaklığında stabil değildir.

Not: Bu çözelti çalışma çözeltisidir, ayrıca 10X konsantrasyonlarda hazırlayarak, kullanılacağı zaman sulandırmak, çözeltinin kontaminasyonunu engellemek açısından önerilmektedir.

3.1.3.6. Örnek Tamponu (5X Sample buffer), (Dunbar 1990; Bollag ve ark., 1996).

Bileşimi	mL/10 mL (v/v)
-----------------	-----------------------

1 M Tris-HCl (pH=6.8)	0.6 (60 mM)
-----------------------	-------------

%50 Glycerol	5 (% 25)
--------------	----------

%10 SDS	2 (% 2)
---------	---------

2-mercaptoethanol	0.5 (14.4 mM)
-------------------	---------------

%1 bromophenol blue	1 (% 0.1)
---------------------	-----------

H ₂ O	0.9
------------------	-----

+4 °C'de birkaç hafta, -20 °C'de birkaç ay stabildir.

3.1.3.7. TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine)

Polimerizasyonun gerçekleşmesi için katalizör olarak kullanılmıştır.

3.1.3.8. SDS-PAGE Boyama Solüsyonu (Coomassie Gel Stain, Coomassie Brilliant Blue-CBB R-250)

Elektroforezden sonra protein fragmentlerinin (bandlarının) görünür hale gelmesini sağlamak için kullanılmıştır (Dunbar 1990; Bollag ve ark., 1996).

Bileşimi

Coomassie Blue R-250	1 g
Methanol	450 mL
Glacial Acetic Acid	100 mL
<u>H₂O</u>	<u>450 mL</u>

Boya metanolde iyice çözüldükten sonra asetik asit ve su ilave edilir. Solüsyonu hazırlandıktan sonra filtre edilerek, renkli, ağzı kapaklı şişede saklanmalıdır.

3.1.3.9. Jelden Boyayı Geri Alma (destaining) Solüsyonu, (Dunbar 1990; Bollag ve ark., 1996).

<u>Bileşimi</u>	<u>mL/L</u>
Methanol	100
Glacial Acetic Acid	100
<u>H₂O</u>	<u>800</u>

3.1.3.10. İstenilen Konsantrasyonda (% X) Ayırıcı Jelin Hazırlanması, (Bollag ve ark., 1996).

Bileşimi

Solüsyon-A	$x/3$ mL
Solüsyon-B	2.5 mL
H ₂ O	$7.5^{-x/3}$ mL
%10 Amonyum Persülfat	50 µL
TEMED	5 µL (eğer $x < 8 \rightarrow 10$ µL)
Total hacim	10 mL

3.1.4. Kitinaz Aktivitesi Üzerine Kimyasalların Etkisini Ortaya Koymak İçin Kullanılan Kimyasallar

Söz konusu kimyasallar iki farklı konsantrasyonda (1-5 mM, %1-5 oranında) hazırlanarak kullanılmıştır (Yuli ve ark., 2004; Lee ve ark., 2006).

DMSO, EDTA, SDS, PMSF, 1,10-Phenantroline, Etil Asetimidat, Fenol Glioksal, N-Etil Melaimit, Sodyum Sülfat (Na_2SO_3), NaCl, CaCl_2 , ZnCl_2 , Üre, MgCl_2 , BaCl_2 , FeCl_3 , MnCl_2 , CuCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , KCl, HgCl_2 .

3.2. Metod

3.2.1. Toprakta *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu

İskenderun Körfezi'nden alınan yengeçler (8 adet) Çukurova Üniversitesi kampus toprağı (1 kg) ve kompost (500 g) ile karıştırılmış ve açık havada 1 ay bekletilmiştir.

Hazırlanan örnekleme karışımına 3 L distile su eklenerek karıştırılmış, 2 saatlik dinlendirmeden sonra üst kısımdan 10 mL örnek alınarak 85 °C'de 10 dakika ön işleme tabii tutulmuştur (Çetin, 1978).

Ön işleme takiben, LB (Luria-Bertoni Broth) besiyerine 2 mL örnek inoküle edilmiş, shakerda (2500 d/dk) 24 saat süreyle 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Elde edilen kültürden, seri sulandırma (10^{-6} - 10^{-7}) yapılarak N₁ Agara tek koloni düşecek şekilde yayma metoduyla ekim yapılmış, 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda tek düşen koloniler (550 adet), kitinli besiyerinde üretilerek sonraki çalışmalar için saklanmıştır (stok kültür şeklinde).

3.2.2. Kitinaz Üreten Suşların CHDA Agarda Saptanması

Bu amaçla CHDA (Wen ve ark., 2002) besiyeri hazırlanmış ve saf kültür olarak izole edilen bütün suşlar, çizgi metoduyla CHDA agara ekilerek 3-5 gün 37 °C'de inkübe edilmiştir. Her gün kontrol edilerek üreme çizgisi hattında ve çevresinde hidroliz zonu (şeffaflaşma) oluşumu gözlemlenmiştir (Cody, 1990). Hidroliz zonu oluşturanlar (12 suş) ayrılmış ve tekrar kitinaz üretme yeteneği açısından CHDA agara ekilerek kitinaz pozitif oldukları kesinleştirilmiştir. Sonuçlar fotoğraflanmıştır.

3.2.3. Plazmid Eliminasyon (Curing) Testi

Fenotip kitinaz pozitif suşların bu geni hangi kalıtım materyali (kromozom/plazmid) üzerinde taşıdığını saptamak amacıyla bu testler yapılmıştır. (Hardy,1993). Bu amaçla;

1-Ethidium bromidin giderek artan konsantrasyonlarını içeren (1-500 µg/mL) 2 mL'lik LB besiyerlerine 20 µL, 1 gecelik bakteri kültürü inoküle edilmiş,

2-1 gece üremeye bırakılmış ve üremenin görüldüğü en yüksek boya konsantrasyonu ihtiva eden tüp seçilmiş,

3-Bu kültür LB ile dilüsyon yapılarak N1 agar üzerine yayma metodu ile ekilmiş, tek kolonilerin üremesi için inkübe edilmiş,

4-Üreyen koloniler tek tek alınarak stok kültürleri hazırlanmış, kitinli besiyerine çizgi metodu ile ekilmiş, 1 gecelik inkübasyondan sonra suşların çevresinde hidroliz zonu aranmıştır.

5-Üreme çizgisi hattında ve çevresinde hidroliz zonu olan suşların kitinaz üretme yeteneğini kromozom üzerinde taşıdığı gözlenmiştir.

3.2.4. Bakterilerin İdentifikasyonu

Kitinaz aktivitesi gösteren (kitinaz pozitif) suşlar; ısısal işleme tabii tutulduktan sonra üreyebilmeleri, spor boyama metodu ile mikroskopta spor formlarının gözlenmesi sonucu *Bacillus* sp. olarak tanılanmış ve bu doğrultuda çeşitli biyokimyasal testler yapılmıştır. Tanılama amacıyla morfolojik ve biyokimyasal parametrelerin yanında, en yüksek kitinaz aktivitesi gösteren *HBK-51* suşu; yağ asiti analizleri ve 16S RNA/DNA dizi analizlerine (Denizci ve ark., 2004) göre tanılanmıştır (Chen ve Kuo, 1993; Holt, 1993; MacFaddin, 2000).

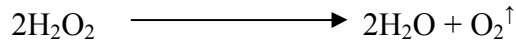
3.2.5. İdentifikasyon Amacıyla Uygulanan Biyokimyasal Testler ve Metodolojileri

3.2.5.1. β -Hemoliz Testi, (Koneman ve ark., 1992).

Tanılanması istenen bakterinin 18-24 saatlik kültürü kanlı agara (BA) çizgi metoduyla ekilir. 24-48 saat inkübasyondan sonra üreme hattı ve çevresinde minimum 2 mm hidroliz zonu görülmesi testin pozitif olduğunu gösterir.

3.2.5.2. Katalaz Testi: Bakterinin katalaz üretme yeteneği test edilmiştir.

Katalaz hidrojen peroksidi parçalayan bir enzimdir (Fridovich, 1978).



Bu deney için bakterinin 18 saatlik kültürü üzerine %3'lük 1 ml H_2O_2 damlatılır. Gaz çıkışının görülmesi testin pozitif olduğunu göstermektedir (Saginur ve ark., 1982).

3.2.5.3. Jelatinin Hidrolizi

Jelatin hayvansal kollojenin protein derivatıdır. Mikroorganizmalar, proteolitik tipte enzim (proteaz) üretme yeteneğinde olabilirler, jelatinin sıvılaştırılması söz konusu ise (gelatinolysis) bakteri jelatinaz üretiyor demektir. Jelatin jelatinaz tarafından hidrolize edildiğinde, jelatini oluşturan amino asitlere kadar parçalanır ve jelleşme yeteneğini kaybeder (Balows ve ark., 1991).

Yüksek tabakalı jelatinli besiyerine iğne öze ile batırma kültür yapılır. 37 ° C de 48-72 saat inkübe edilir. Kültür buzdolabına alınarak 24 saat bekletilir, eğer besiyeri katılaşmazsa test sonucu pozitifdir.

3.2.5.4. Hareket Testi

%0,5 agar bulunan yumuşak jeloz besiyerine iğne öze ile batırma kültür yapılır. Bir gecelik inkübasyondan sonra bakteri ekim çizgisinden besiyerine yayılım gösterirse test sonucu pozitifdir. Hareketsiz bakterilerde üreme sadece ekim çizgisi boyunca olur (etin, 1978).

3.2.5.5. Simon’s Sitrat Testi

Bakteriler besin kaynağı olarak sitratı kullanabilirler. Simmons’un sitratlı besiyerine yayma metoduyla bakteri ekilerek 37  C de 1-3 gün bekletilir. Eğer besiyerindeki indikatörün (brom timol mavisi) rengi maviye dönerse test sonucu pozitifdir (etin, 1978).

3.2.5.6. İndol Testi

Triptofandan uğucu indol oluşumunu gözlemlemek amacıyla yapılmıştır (Baron ve Finegold, 1990).

Triptofan içeren (%1) sıvı besiyerine bakterinin 16 saatlik kültüründen inoküle edilir. Oksalik asit çözeltisine batırılmış ve kurutulmuş filtre kağıdı besiyerine değmeyecek şekilde tüpün içine sarkıtılır. 37  C’de 1-4 gün inkübe edilir. Her gün kontrol edilir, kağıtta pembe rengin oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

3.2.5.7. Voges- Proskauer Testi

Bu test karbonhidrat metabolizmasının ara ürünü olan asetil-metil-karbinoln oluşumu temeline dayanır. Bu madde KOH ve hava varlığında diasetile okside olur. Diasetil ise - α -naftol ve peptonda bulunan bir aminoasit olan arginin varlığında 2-4 saat içinde karışıma kırmızı bir renk verir. Clack-Lubs besiyerine 0.5 mL bakterinin 24 saatlik kültüründen ekilir. 37  C de 2-4 gün bekletilir. Kültüre 1 mL indikatör damlatılır, beklenir. Kırmızı renk oluşumu testin pozitif olduğunu gösterir (Clark ve Lubs, 1915).

3.2.5.8. Lesitinin Hidrolizi

Yumurta sarısı ile hazırlanmış besiyerine çizgi metodu ile bakteri ekimi yapılır. 37 °C’de 24-48 saat inkübe edilir. Bakteri lesitinaz üretmişse üreme hattı çevresinde opaklaşma görülür, bu durum pozitif sonucu gösterir (Hayward, 1941; McClung ve Toabe, 1947).

3.2.5.9. Ürenin Hidrolizi

Bakteriler eğer üreaz üretme yeteneğinde ise üreyi parçalayarak amonyak (NH₃) üretirler. Üreli besiyerine bakteri, azaltma metoduyla ekilir. 37 °C’de 1 gece bekletilir. Besiyeri ve bakteri kolonileri kırmızı renk alırsa testin sonucu pozitifdir (Christensen, 1946; MacFaddin, 2000).

3.2.5.10. Nişastanın Hidrolizi Testi

Nişasta suda çözünmediğinden bakteriler için iyi bir besin kaynağı değildir. Bazı bakteriler amilaz üreterek nişastayı maltoza parçalarlar. Böylece bakteri nişastayı kullanabilecek şekilde indirgemiş olur.

Nişasta içeren besiyerine bakteri çizgi şeklinde ekilir. 37 °C’de 24-48 saat inkübe edilir. Bakteriler (petri kutusu) iyod buharına tutulur veya direkt iyod çözeltisi kültür üzerine dökülür. 5-10 dakika bekletilir. Nişastanın hidrolize olduğu alanlar renksiz, diğer alanlar mavi renkli görünür (Koneman ve ark., 1997).

3.2.5.11. *Bacillus* HBK-51 Suşunun 16S RNA Analizi**16S rRNA Reaksiyon Koşulları ve PCR KARIŞIMI**

Kalıp DNA	1µl (60ng)
dNTP	5 µl (2mM)

Buffer(pFu 10x)	5 µl
27F primer	2 µl (25pmol / µl)
1525R primer	2 µl (25pmol / µl)
pFU	0,5 µl
Distile Su	32,5 µl
Toplam hacim	50 µl

PCR KOŞULLARI

98°C	5 dakika	
96°C	1 dk	
47°C	1dk	35 DÖNGÜ
72°C	3dk	
Son uzama	72 °C	5dk

Kullanılan Primerler**27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'****8-27 POZİSYON****1525R 5'AAGGAGGTGWTCCRCC 3'****1541-1525 POZİSYON****530F 5'GTGCCAGCMGCCGCGGTAA3'****515-533 POZİSYON****1100R 5'AGGGTTGCGCTCGTTG3'****1115-1100 POZİSYON**

Bu primerler ile 16SrRNA geni çoğaltılmıştır. Daha sonra; Aynı primerler ve bunlara ek olarak 530F ve 1100R primerleri de kullanılarak Beckman coulter CQ 8800 model dizi analizi cihazı ile firma tarafından verilen yöntem kullanılarak Dye terminator Cycle Sequencing ile işaretlenerek dizi analizi yapılmıştır. Ham datalar işlenerek dizi elde edilmiştir.

Benzerlik araştırması (GenBank/EMBL/DDBJ) Basic Local Alignment Search Tools (Blast) programı (Altschul ve ark., 1990) ve referans veritabanları kullanılarak yapılmıştır.

3.2.6. Koloidal Kitinin Hazırlanması

Firmadan (fluka, sigma) alınan kitin Wen ve ark.'nın (2002), Roberts ve Selitrennikoff'tan modifiye ettikleri metoda göre hazırlanmıştır.

Buna göre;

1-5 g toz halindeki kitin, 60 mL konsantre HCl'e yavaş yavaş ilave edilmiş, iyice karıştırıldıktan sonra, +4 °C'de bir gece yüksek devirde (400 devir/dk) çalkalayıcıda çalkalanmıştır.

2-Karışım 2 L soğuk %95'lik etanole ilave edilmiş ve bir gece 25 °C'de bekletilmiştir.

3-Oluşan presipitat 5000 g'de 20 dk +4 °C'de santrifüj edilerek bir arada toplanmıştır.

4-Steril distile su ile, koloidal kitin nötral (pH=7.0) oluncaya kadar yıkama işlemi yapılmıştır (steril su ile homojenizasyon, sentrifikasyon [5000 g'de 20 dk +4°C'de]).

5-Kolloidal kitin solüsyonu (%5) hazırlanarak kullanılmaya kadar +4°C'de saklanmıştır.

3.2.7. Enzim (Kitinaz) Üretimi, (Wen ve ark., 2002).

1-En iyi enzim üreticisi olarak tanılanan *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* stok kültürü 5 mL %1 koloidal kitin içeren LB'ye inoküle edilerek 37 °C'de, çalkalayıcıda (1500 devir/dk) 24 h üretilmiştir.

2-Kültür, 500 mL (2 L hacimli erlenmayerde) %1 koloidal kitin içeren M9 besiyerine transfer edilmiş ve 3 gün inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.8. Enzimin Eldesi (Etanol ile Presipitasyon)

1-3 günlük bakteri kültürü 15000 g'de +4 °C'de, 20 dk santrifüj edilerek, hücre ihtiva etmeyen süpernatant (ekstraselüler enzim olan kitinaz süpernatantta

olduğu için) toplanmıştır (Franskowski ve ark., 2001).

2-Süpernatant kaba filtre kağıdı ile (Whatman, 5) süzölmüş ve üzerine hacminin %70'i oranında %96'lık soğuk etanol eklenmiş, -33 °C'de 24 h bekletilmiştir.

3- +4 °C'de 20 dk 10000 rpm'de sentrifüj edilerek enzim, sıvı fazdan geri kazanmak için çöktürölmüştür. Çökelti, 0.1 M sodyum fosfat (pH=7.0) tamponunda çözölerek, +4 °C'de saklanmıştır (Srivastava, 1987; Folders ve ark., 2000).

3.2.9. Besiyerinde Kitinaz Aktivitesinin Saptanması

CHDA besiyeri üzerinde durham tüpü ile açılan kuyucuğa, kısmi saflaştırılmış enzim preparasyonundan 1 mL damlatılarak 37 °C'de 2 gün bekletilmiştir. 2. saatten sonra aralıklarla (4 saatte bir) besiyeri kontrol edilerek kitinin hidrolizi gözlenmiştir (Muzzarelli ve Peter, 1997).

3.2.10. Kitinaz Aktivitesinin Kitin-Azure İle Saptanması

Reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

1 mL enzim preparasyonu (kısmi saflaştırılmış)

1 mL 0.2 M sodyum-fosfat tamponu (pH=7.0)

5 mg chitin-azure karıştırılmış ve 1/2 h 50 °C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyonu takiben tüpler 7000 rpm'de +4°C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant temiz tüplere alınmıştır. Bu denemeler 3 paralel şekilde hazırlanmıştır. Enzim ihtiva etmeyen kör (blank) tüp ile spektrofotometre sıfırlanmış ve 560 nm dalga boyunda değerler okunmuştur. **Kitinazın bir ünitesi (Unite=U) absorbans değerinde 0.01 artışa sebebiyet veren enzim miktarıdır** ((McCreath ve Gooday, 1992; Ramirez ve ark., 2003).

3.2.11. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması

Aktivite tayini için substrat olarak *kitin-azure* (chitin-azure) kullanılmıştır. Enzim kısmi saflaştırma yöntemi (etanol ile presipitasyon) ile hazırlanmıştır.

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH aralığını saptamak amacıyla;

Sitrat (pH=4.0-5.5),

Na-fosfat (pH=6.0-8.0),

Glisin-NaOH (pH=8.5-10.5),

Boraks-NaOH (pH=11.0-12.5) tampon sistemleri kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

50 °C’de, 1/2 h, söz konusu tamponlarda (enzim + tampon) inkübasyon yapıldıktan sonra, enzim aktivitesi 560 nm dalga boyunda UV visible (Cecil-5500) spektrofotometrede köre karşı absorbands değerleri okunmuştur (her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır). Bu aşamada reaksiyon karışımına aktivite tayininde olduğu gibi 5 mg kitin azure ilave edilmiştir (Kim ve ark., 2007).

Kör; tampon ve kitin azure ile hazırlanmıştır.

3.2.12. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanması

Kitinazın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık aralığını saptamak amacıyla enzim; 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 °C’de inkübe edilmiştir. Inkübasyon için 90 °C’ye kadar su banyosu, 100 °C ve üzerindeki sıcaklıklar için yağ banyosu kullanılmıştır.

Reaksiyon Karışımı

1 mL enzim

1 mL boraks tamponu (pH=11.0) [enzimin optimum aktivite gösterdiği pH]

5 mg chitin-azure karıştırılmıştır.

Belirtilen sıcaklıklarda 1/2 saat inkübe edilmiş karışım santrifüj edilerek 560 nm dalga boyunda değerler okunmuştur. En yüksek absorbens değerinin elde edildiği sıcaklık temel alınarak % rölatif aktivite hesaplanmıştır (Kim ve ark., 2007).

3.2.13. Enzimin Sıcaklık Stabilesinin Saptanması

Sıcaklık stabilesinin saptanabilmesi amacıyla, enzim preparasyonu; 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 °C sıcaklıklarda enzim 3h ön inkübasyona tabii tutulmuştur. İnkübasyonu takiben;

0.5 mL enzim

0.5 mL kitin azure (pH=9.0)

Karıştırılmış ve optimum aktivitenin görüldüğü sıcaklıkta (110 °C) 1/2h inkübasyon yapılmış ve santrifüj edilerek spektrofotometrede değerler okunmuştur.

Enzimin orijinal aktivitesinin saptanabilmesi için, ön inkübasyona tabii tutulmamış enzim ve substrat karıştırılmış ve optimum sıcaklık değerinde (110 °C) aktivite tayini yapılmıştır (Favaloro ve ark., 1980; Kim ve ark., 2007).

3.2.14. Enzimin pH Stabilesinin Saptanması

Enzim preparasyonu, saklandığı tampondan (pH=9.0) santrifüj işlemi ile kurtarılmış ve farklı pH aralığındaki, tampon içerisinde resüspanse edilerek (pH; 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0) 3 h ön inkübasyon yapılmıştır.

Aktivite tayini için ön inkübasyona tabii tutulmuş enzim ve substrat (pH=9.0) karıştırılarak, optimum aktivite sıcaklığında (110 °C) 1/2h inkübasyon yapılmış ve değerler spektrofotometrede okunmuştur (Favaloro ve ark., 1980; Kim ve ark., 2007).

3.2.15. Çeşitli Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

Farklı kimyasalların enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini saptamak amacıyla kimyasallar iki farklı konsantrasyonda (1 mM-5mM, %1-%5) kullanılmışlardır. Bunlar;

1 -5mM

EDTA, PMSF, 1,10 Phenantroline, Etil Asetimidat, Fenol Glioksal, N-Etil Melaiimit, Sodyum Sülfid (Na_2SO_3), NaCl, CaCl_2 , ZnCl_2 , Üre, MgCl_2 , BaCl_2 , FeCl_3 , MnCl_2 , CuCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , KCl, HgCl_2

%1-5

SDS, DMSO

Bu amaçla, 0.5 mL enzime söz konusu kimyasallar belirtilen konsantrasyonlarda (son konsantrasyon) ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonu takiben 0.5 mL substrat (pH=9) ilave edilmiş, optimum sıcaklıkta 30 dk inkübasyon yapıldıktan sonra spektrofotometrede değerler okunmuştur (Nawani ve Kapadnis, 2004).

Kontrol için hazırlanan tüpteki enzime herhangi bir kimyasal ilavesi yapılmamıştır.

3.2.16. SDS-PAGE Yöntemi İle Enzimin Moleküler Ağırlığının Saptanması

Bu amaçla %12 konsantrasyonda ayırıcı jel ve %5 konsantrasyonda dengeleyici jel hazırlanmıştır. 66 kDa ağırlığında albümin marker protein (MP) olarak kullanılmıştır. Örnekler örnek hazırlama tamponu içerisinde hazırlandıktan sonra, 100 μL miktarda jelle yüklenmiş, 30 mA'de 7 h elektroforez ekipmanında yürütülmüştür.

Elektroforez işleminden sonra jel dikkatlice cam plakalar arasından çıkarılarak boyama küvetine alınmış ve CBB R-250 ile 3 saat oda sıcaklığında boyanmıştır.

Boyama işlemini takiben 20 h süreyle destaning (boyadan kurtarma) solüsyonunda bekletilen jel, %1 gliserol ihtiva eden distile su içerisinde 4 h bekletilmiş ve jel görüntülenmiştir. Jelde yürütülen marker protein ile enzim kıyaslanarak yaklaşık moleküler ağırlık hesaplanmıştır (Dunbar 1990; Bollag ve ark., 1996).

3.2.17. Kitinaz Enziminin Kalorifer Böcekleri (*Blatella germanica*, Ordo: Orthoptera, Fam: Blatellidae) zerine Etkisi

Bu amaçla; kalorifer böcekleri (*Blatella germanica*) toplandıktan sonra, 1 gece etil alkolde bekletilmiş ve steril distile su ile yıkanarak alkolden kurtarılmıştır.

Böcekler tek tek cam deney tüpüne alınarak, üzerine 5 mL enzim preparasyonu (pH=9.0) ilave edilerek 50 ° C’de bir hafta inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda bceklerdeki morfolojik değişimler gözlemlenmiştir (Lopez-Meza ve ark., 1995; Thamthiankul ve ark., 2001).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Topraktan *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu

İskenderun Körfezi'nden alınan yengeçler (8 adet) Çukurova Üniversitesi kampus toprağı (1 kg) ve kompost (500 g) ile karıştırılmış ve açık havada 1 ay bekletilmiştir.

Hazırlanan örnekleme karışımına 3 L distile su eklenerek karıştırılmış, 2 saatlik dinlendirmeden sonra üst kısımdan 10 mL örnek alınarak 85 °C'de 10 dakika ön işleme tabii tutulmuştur (Çetin, 1978).

Ön işlemleri takiben, LB (Luria-Bertoni Broth) besiyerine 2 mL örnek inoküle edilmiş, shakerda (2500 d/dk) 24 saat süreyle 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Elde edilen kültürden, seri sulandırma (10^{-6} - 10^{-7}) yapılarak N₁ Agara tek koloni düşecek şekilde yayma metoduyla ekim yapılmış, 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 550 adet suş seçilmiş, kitinli besiyerinde üretilerek sonraki çalışmalar için stok kültürleri hazırlanmıştır.

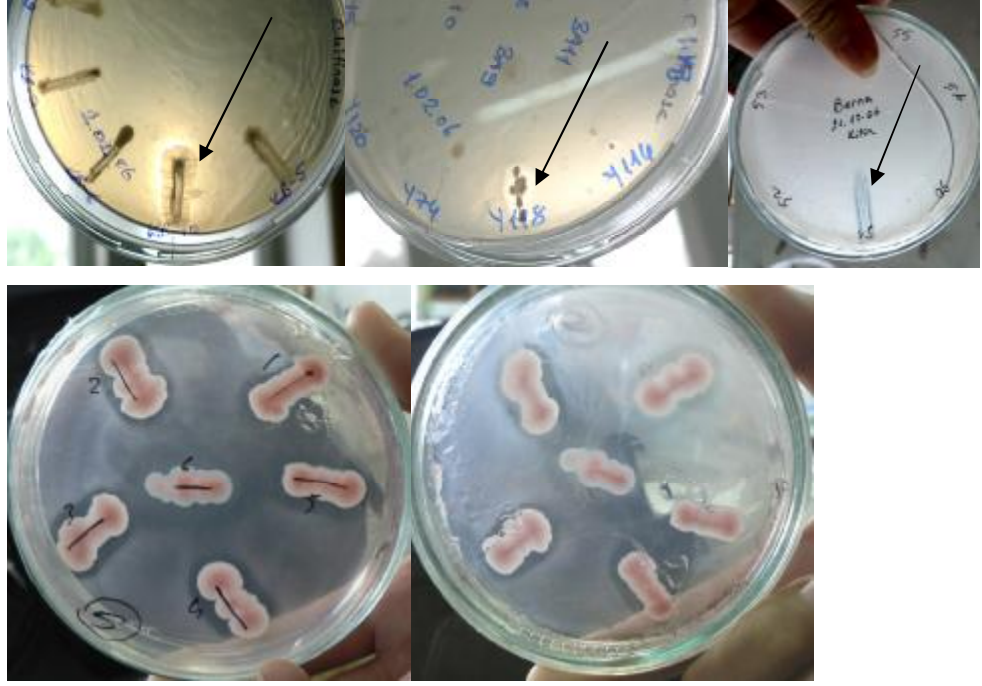
4.2. Kitinaz Üreten Suşların CHDA Agarda Saptanması

Bu amaçla CHDA (Wen ve ark., 2002) besiyeri hazırlanmış ve saf kültür olarak izole edilen bütün suşlar, çizgi metoduyla CHDA agara ekilerek 3-5 gün 37 °C'de inkübe edilmiştir. Her gün kontrol edilerek üreme çizgisi hattında ve çevresinde hidroliz zonu (şeffaflaşma) oluşumu gözlemlenmiştir.

İzole edilen toplam 550 bakteri suşundan 12 tanesinde (%2.18) kitinaz üretme yeteneği saptanmıştır. Bunlar arasında CHDA agarda en iyi hidroliz zonu oluşturanlar (4-10 mm); **HBK-30, HBK-36, HBK-37, HBK-42, HBK-43, HBK-51** olarak isimlendirilmişlerdir.

Liu ve ark. (2002), *Bacillus thuringiensis*'in 70 standart suşunu kitinaz aktivitesi bakımından test etmişler ve bunlardan 32 tanesinde herhangi bir aktivite gözlemleyememişlerdir. Diğerleri ise hem katı besiyerinde hem sıvı besiyerinde kitinaz aktivitesi göstermiştir. Fakat bunlar arasından en yüksek aktivite gösteren

T04A001 (355 U mL⁻¹) ve T13003 (314 U mL⁻¹) kod numaralı suşları çalışmada kullanmışlardır.



Şekil 4.1. CHDA’da kitinaz aktivitesi

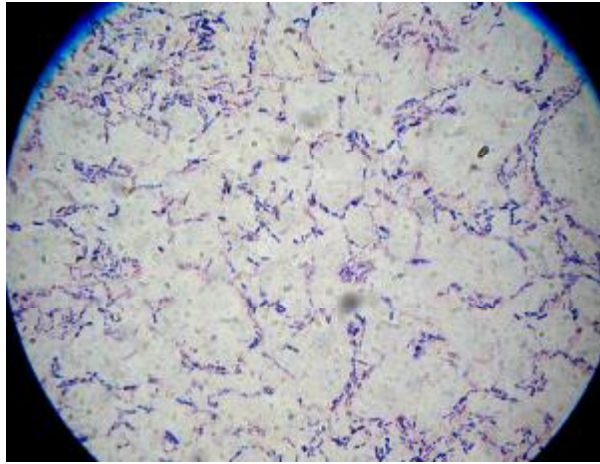
4.3. Plasmid Curing (Eliminasyon) Sonuçları

Kitinaz aktivitesi pozitif 12 *Bacillus* suşu farklı konsantrasyonlarda EtBr içeren LB’de üretilmiş ve subletal konsantrasyonda üreyen kültürden tek koloni şeklinde izole edilen bakteriler kitinaz aktivitesi için test edilmiştir. Bunlardan en yüksek aktivite gösteren **HBK-51** suşu da dahil 10 (%83.33) tanesinde kitinaz geninin kromozom üzerinde taşındığı saptanmıştır. Çünkü EtBr içeren LB’de üretilmiş olmalarına rağmen (plazmidini kaybetmiş) kitinaz aktivitesi devam etmiştir.

4.4. Bakteri İdentifikasyonu (Tanımlanması)

Tanımlama amacıyla morfolojik (besiyerinde üreme, spor oluşturma, gram boyanma karakteristiği) ve biyokimyasal parametrelerin yanında (Holt, 1993; MacFaddin, 2000) en yüksek kitinaz aktivitesi gösteren **HBK-51** suşu; yağ asiti analizleri (Sherlock-MIDI Automated Microbial Identification System, Sherlock Microbial Identification System version 4.0, MIDI inc., Newark, DE) ve 16S RNA/DNA dizi analizlerine (Denizci ve ark., 2004; Kim ve ark., 2007) göre tanımlanmıştır.

Gram boyama metodu ile boyanan bakteri örneği, ışık mikroskopunda incelendiğinde, Gram (+), santral sporlu, çubuk şeklinde organizma olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. Gram Boyamanın Mikroskopik Görüntüsü

Uygulanan Biyokimyasal testler çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Söz konusu testlerden; hareket, katalaz, β -hemoliz, nişastanın hidrolizi, simmon’s sitrat test sonuçları **pozitif**, indol oluşumu, üreaz, lesitinaz, jelatinaz, voges-proskauer test sonuçları **negatif** bulunmuştur (McFaddin, 2000). Ayrıca bakterinin kapsül oluşturmadığı kapsül boyama metodu ile gözlenmiştir (Çetin, 1978).

Biyokimyasal testlerden bazılarının pozitif sonuçları şekillerle gösterilmiştir (Şekil 4.3, 4.4, 4.5).



Şekil 4.3. Simmon's Sitrat Agar'da Pozitif Sonuç



Şekil 4.4. Nişastanın Hidrolizi

Şekil 4.5. Kanlı Besiyerinde β -hemoliz

Çizelge 4.1 **HBK-51 Suşunun** İdentifikasyonunda Kullanılan Biyokimyasal Testler

Yapılan biyokimyasal testler	<i>Bacillus</i> HBK-51 suşu
Gram boyama	+
Spor	+
Kapsül	-
Hareket	+
Katalaz	+
β -hemoliz	+
İndol oluşturma	-
Üreaz	-
Lesitinaz	-
Jelatinaz	-
Nişasta hidrolizi	+
Voges-proskauer	-
Cimmon's citrat	+

+: pozitif, -: negatif,

Söz konusu analizler sonrasında bu araştırmada *kitinaz üreticisi* olarak kullanılan HBK-51 suşu; *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* olarak tanımlanmıştır.

4.5. Enzim (KİTİNAZ) Üretimi

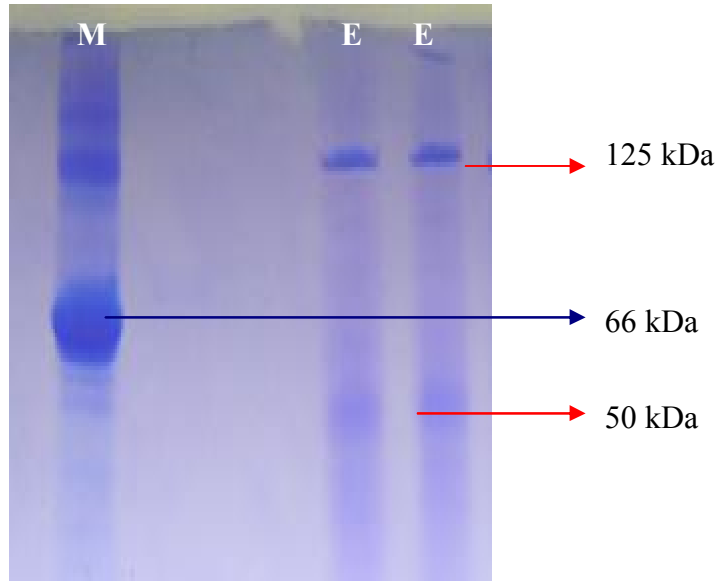
En iyi enzim üreticisi olarak tanılanan *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* %1 kolloidal kitin içeren M9 besiyerinde 3-5 gün, 37 °C'de üretilmiş ve kültür süpernatantından enzim preparasyonu elde edilmiştir.

Wiwat ve ark. (1999), %0.3 kolloidal kitinli M9'da 35 °C'de, 5 gün *Bacillus circulans* No.4.1 suşunu üretmişler ve enzim izole etmişlerdir. Wen ve ark. (2002), %1 kolloidal kitin içeren M9 besiyerinde 3 gün, 37 °C'de *Bacillus* sp. NCTU2 suşundan başarılı bir şekilde kitinaz elde etmişlerdir.

4.6. Kitinazın Moleküler Ağırlığının Hesaplanması

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* HBK-51 suşundan elde edilen kitinaz enzimi SDS-PAGE’de analiz edilmiştir.

Marker protein olarak sığır albümini (BSA, mw=66 kDa) kullanılmıştır. Marker proteinin jelde kattettiği mesafe dikkate alınarak enzime ait 2 band, 125 kDa ve 50 kDa olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.6’da kitinazın SDS-PAGE analizi görülmektedir. Enzimin 2 band şeklinde saptanması, kitinazın izoformları olabileceğine işaret etmektedir. Araştırmacılar farklı büyüklüklerde kitinaz izoformları izole etmişlerdir.



M: Marker (BSA, 66 kDa), **E:** Enzim preparasyonu (HBK-51 den izole edilmiş kitinaz)

Şekil 4.6. SDS-PAGE’de Moleküler Ağırlığın Gösterilmesi

Guo ve ark. (2004) *Aeromonas schubertii*’ye ait kitinazın SDS-PAGE analizinde 30, 38, 75 ve 110 kDa 4 farklı band saptamışlar ve her birinin SDS direncine baktıklarında 75 kDa’lık fraksiyonun SDS dayanıklılığını en yüksek bulmuşlardır.

Tantimavanich ve ark. (1998), *Bacillus licheniformis* TP-1 suşunun kültür süpernatantından izole ettiği kitinazın aktivite bandlarını non-denatüre SDS-PAGE’de gözlemlemişler ve 3 band elde etmişlerdir. Bu bandların moleküler ağırlığı; **68, 62 ve 50 kDa** (Chi68, Chi62, Chi50 şeklinde isimlendirilmiş) olarak saptanmıştır.

Gomes ve ark. (2000), 68 ve 80 kod numaralı iki *Streptomyces* suşundan kitinaz izole etmiş ve SDS-PAGE’de glikol kitini substrat olarak kullanarak aktivite analizi yapmışlardır. Her iki suşta glikol kitini hidroliz etmiş, 68 nolu suşa ait kitinaz **67, 200, 35 ve 25 kDa** boyutlarında **farklı izoformlar** şeklinde saptanmıştır.

Wen ve ark. (2002), *Bacillus* sp. NCTU2 suşundan izole edilen kitinazı SDS-PAGE’de analiz ettiklerinde moleküler ağırlığını 36.5 kDa bulmuşlardır.

Bhushan (2000) *Bacillus* sp. BG-11 suşundan izole ettiği kitinazı, %10’luk SDS-PAGE’de (%0.1 w/v SDS içeren) analiz ettiğinde molekül ağırlığını 41 kDa olarak saptamıştır.

Patil ve ark. (2000) *Streptomyces* tarafından iki tip kitinaz sentezlendiğini, Sakai ve ark. (1998), *Bacillus* sp.’nin 25-80 kDa aralığında farklı moleküler ağırlıkta 3 kitinaz sentezlediğini, Ueda ve Arai (1992), *Aeromonas* sp.’nin 89-120 kDa aralığında değişen çok sayıda kitinaz formu ürettiğini bildirmişlerdir.

Bakteriler farklı formlarda kitinaz enzimi üretebilmektedirler ve muhtemelen bunlar doğadaki farklılık gösteren kitin moleküllerini hidroliz edebilme yeteneğindedir. Enzimin farklı formları bakteri üremesinin farklı dönemlerinde sentezlenmektedir ve çevre koşulları-besin değişkenliği ile bu genlerin ekspresyonları etkilenmektedir (Ueda ve Arai, 1992; Sakai ve ark., 1998; Patil ve ark., 2000).

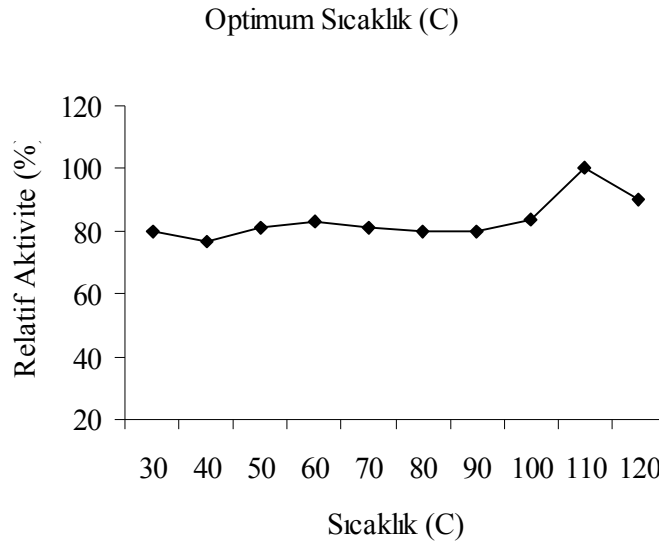
4.7. Optimum Sıcaklık

Enzim optimum aktivitesini 110°C de göstermiştir. Aktivite çalışmalarının gerçekleştirildiği 30-120°C aralığındaki bütün sıcaklık değerlerinde elde edilen aktivite ortalama %83.6 dır. Enzim aktivitesi 100-120°C aralığında ortalama %91.3

değerine yükselmiştir. Özellikle 100-120°C aralığındaki aktivite artışı enzimin hiper termofil özellikte olduğunu göstermektedir.

Bütün sıcaklık değerleri dikkate alındığında, enzim aktivitesinin ortalama % 83.6 değerine ulaşması, aktivite aralığının **mezofil-hipertermofil** olduğunu kanıtlamaktadır. Bu özellikleri enzimin uygulama alanının çeşitlenmesine katkıda bulunacaktır.

Lee ve ark. (2006) *Bacillus* sp. DAU101 suşundan izole ettikleri kitinazın optimum sıcaklık aktivitesini 60 °C, Vaidya ve ark. (2003), *Alcaligenes xylosoxydans* kitinazı'nın 50 °C, Brushan ve Hoondal (1998) *Bacillus* kitinazlarının 45-55 °C'de optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.



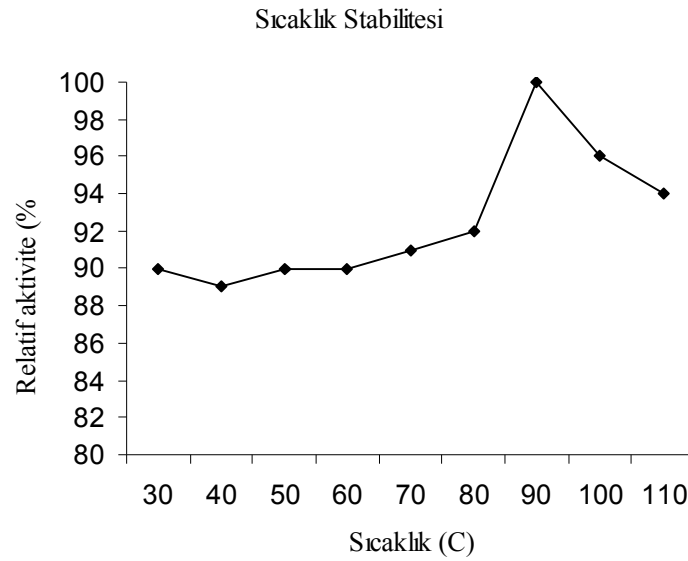
Şekil 4. 7. Kitinaz aktivitesi üzerine sıcaklığın (°C) etkisi

Wiwat ve ark. (1999) *Bacillus circulans* No.4.1 suşuna ait kitinazın 40 °C ve optimum aktivite gösterdiğini, *Alteromonas* sp. O-7 suşuna ait kitinazın benzer özellikler gösterdiğini (Tsuji ve ark., 1992) bildirmişlerdir.

4.8. Termal Stabilité

°C	%
30	90
40	89
50	60
60	90
70	91
80	92
90	100
100	96
110	94

Enzim bütün sıcaklık değerlerinde (30-120 °C) oldukça stabil bir aktivite göstererek, orijinal aktivitesini ortalama %92.4 oranında korumuştur. En yüksek stabilite değeri (%100) 90 °C de elde edilirken, 100-110 °C aralığında %96 kalan aktivite saptanmıştır. Bu özellikleri dikkate alındığı zaman, enzimin yüksek düzeyde termostabil olduğu görülmektedir.



Şekil 4.8. Kitinaz enziminin sıcaklık stabilitesi.

Sıcaklık stabilite denemeleri için enzim farklı sıcaklıklarda 3 h ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre içerisinde 90 °C’de en yüksek aktivite göstermiştir. 110 °C’de %96 kalan aktivite saptanmış olması termostabilite için oldukça önemli ve yüksek bir değerdir. Yuli ve ark. (2004) *Bacillus* sp. 13.26 kitinazının 70 °C’de 5 saatlik sürede stabil kaldığını ve bakterial kitinazlar için bunun ilk rapor edilmiş sonuç olduğunu bildirmişlerdir bu durum arkea kitinazlarını geride bırakmıştır. **Bu termostabilitenin; yoğun elektrostatik interaksyon (ör; tuz köprülerinin formasyonu), hidrojen bağları, hidrofobik interaksyonlar, intramoleküler disülfid bağları ve enzim molekülünün sıkı paketlenmesinden olabileceği belirtilmiştir** (Adams ve Kelly, 1998).

Bu çalışmada üretilen kitinazın optimum 110 °C’de aktivite göstermesi ve 3 saat 90 °C’de stabilitesini koruması termostabilitenin moleküler mekanizmasını çalışmak için potansiyel bir enzim olduğunu göstermektedir.

4.9. Optimum pH

pH	%
3	51
4	50
5	59
6	57
7	73
8	96
9	100
10	62
11	30

Kitinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 9.0 olarak bulunmuştur. Enzim pH 3.0’te %51 aktivite gösterirken, pH 3.0-6.0 aralığında ortalama %54.25 aktiviteye sahiptir. Enzim aktivitesi pH 7.0’de aniden artış

göstererek %73'e, pH 8.0'de ise %96'ya yükselmiştir. Optimum aktivite değeri pH 9.0'da (%100) elde edilirken, pH 10.0'da %62, pH 11.0'de %30 değerlerine hızlı bir düşüş gözlenmiştir. Enzim aktivitesinin özellikle pH 9.0'dan sonra hızla düşmesi, enzimin yüksek alkali pH'larda fazla aktif olmadığını göstermektedir.

Bununla birlikte pH 7.0-9.0 aralığında ortalama %90 aktivite elde edilmiş olması enzimin orta düzeyde alkali özellik taşıdığının göstergesidir. Asidik pH aralığında (pH 3.0-6.0) ortalama %54.25 aktivite elde edilmesi, enzimin asidik uygulamalar içinde uygun olabileceğini kanıtlamaktadır.

Lee ve ark. (2006) *Bacillus* sp. DAU101 suşuna ait kitinazın pH=7.5 (nötral), Guo ve ark. (2004) *Aeromonas schubertii*'den izole ettikleri kitinazın pH=4.8'de (asidik) maksimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

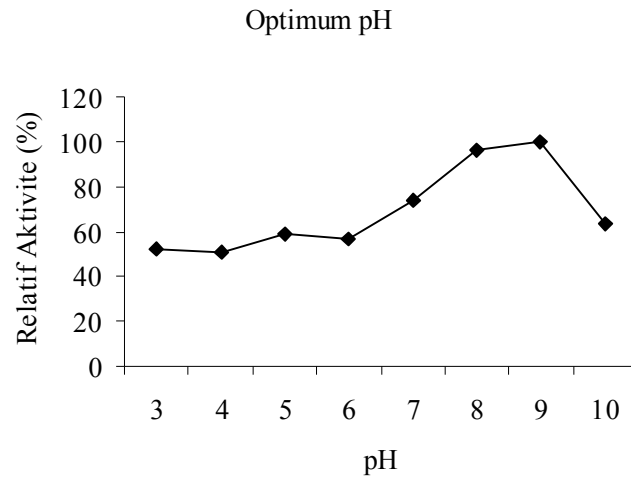
Vaidya ve ark. (2003), *Alcaligenes xylosoxydans* kitinazı ile çalışmışlar ve enzim pH=5.0'da optimum aktivite göstermiştir.

Brushan ve Hoondal (1998) *Bacillus* kitinazlarının geniş pH 7.5-9.0 aralığında optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Wiwat ve ark. (1999) *Bacillus circulans* No.4.1 suşuna ait kitinazın pH=8.0'de optimum aktivite gösterdiğini, *Alteromonas* sp. O-7 suşuna ait kitinazın benzer özellikler gösterdiğini (Tsuji ve ark., 1992) bildirmişlerdir.

Yuli ve ark. (2004) *Bacillus* sp. 13.26 suşuna ait kitinazın nötral pH'da optimum aktivite gösterdiğini ve *Pseudomonas aeruginosa* K-187 (Wang ve Chang, 1997) suşuna ait kitinaza benzediğini bildirmişlerdir. *Beauveria bassina*'dan elde edilen kitinaz pH=9.2'de oldukça aktif olup (Suresh ve Chandrasekaran, 1999) **bu çalışmada izole edilen kitinaz optimum pH= 9.0'da aktivite göstermektedir.**

Watanabe ve ark. (1992) ve Yabuki ve ark.'na göre (1986) pek çok kitinazın asidik, Ohishi ve ark. (1996) ve Ueda ve Arai'a göre (1992) pek çok kitinazın alkali olduğu, *B. circulans* No.4.1'in (Wiwat ve ark., 1999) ve *B. circulans* WL-12'nin (Watanabe ve ark., 1992) alkali olduğu saptanmıştır. Alkali kitinazlar, *B. thuringiensis* temelli biopestisid (lepidoptera larvalarının biokontrolünde) üretiminde oldukça kullanışlı bir enzimdir. Çünkü lepidoptera larvalarının barsakları alkali pH'dadır (Berenbaum, 1980).



Şekil 4.9. Kitinaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Genel olarak değerlendirildiği zaman pH 3.0-10.0 aralığında ortalama % 68.5 aktivite değerinin elde edilmesi, kitinaz enziminin asido-alkalofil özelliğe sahip olduğunu göstermektedir.

4.10. pH Stabilitesi

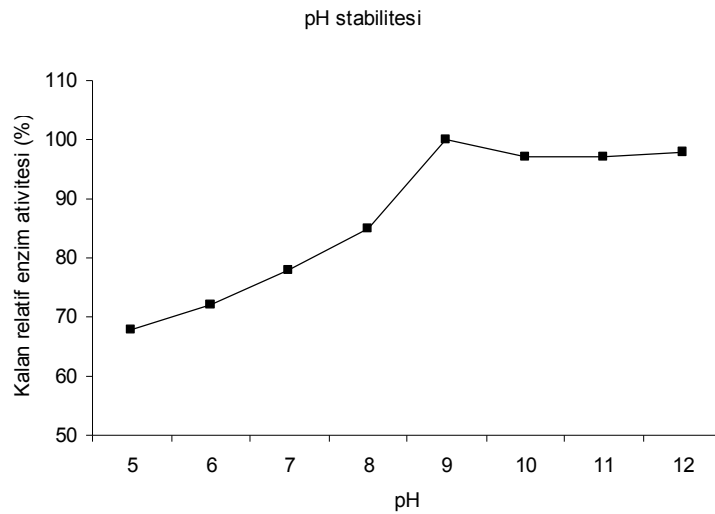
pH	%
5	68
6	72
7	78
8	85
9	100
10	97
11	97
12	98

Enzim pH 5.0'da 110 °C sıcaklık ve 3 saat inkübasyon süresi sonunda orijinal aktivitesini ortalama %68 oranında korumuştur. pH 9.0'da 110 °C sıcaklık ve

3 saat sürede orijinal aktivite %100 oranında korunurken, pH 10.0-12.0 aralığında başlangıç aktivitesinin ortalama %97.3 oranında korunduğu saptanmıştır. pH sabitliğiyle ilgili çalışmalarda pH 5.0-8.0 aralığındaki kalan aktivite değeri ortalama %75.25 olarak bulunmuştur.

Bütün pH değerleri dikkate alındığı zaman 110 °C’de ve 3 saat süreyle ön işleminden geçirilen kitinaz enziminin aktivite analizi sonucunda orijinal aktivitesini ortalama %87 oranında koruduğu saptanmıştır. Gerek bütün pH değerleri ve özellikle pH 9.0-12.0 aralığındaki kalan aktivite değeri (ortalama %98) kitinaz enziminin pH **stabil olduğunu ve alkaline özellik** taşıdığını göstermektedir.

Wen ve ark. (2002), *Bacillus* sp. NCTU2 suşundan izole edilen kitinazı karakterize etmişlerdir. Araştırmacıların bulgularına göre, söz konusu kitinaz koloidal kitini geniş bir pH aralığında etkin bir şekilde hidroliz etmektedir. Optimum pH değeri 7.0’dır. pH sabitliği 4.0-10 aralığında çalışılmış olup, pH 5.5-9.0 aralığında optimal enzim aktivitesi en az %60 olarak gözlenmiştir. pH=6.0-8.0’de 60 °C’de enzim sabitliğini korumuştur. Optimum sıcaklık değeri 50-60 °C dolaylarında olup, 60 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda enzim instabildir. Enzim 60 °C’de 180 dk ön inkübasyona bırakıldığında herhangi bir aktivite kaybına uğramadığı halde 70 °C ve yukarı sıcaklıklarda aktivitenin hızla düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 4. 10. Kitinaz Enziminin pH Sabitliği

Nötral kitinazlar genellikle medikal amaçlar için kitooligosakkarit üretim proseslerinde kullanılmaktadır (Yuli ve ark., 2004).

Ayrıca; Hou ve arkadaşları (1998); farklı bitkilere ait çeşitli kitinaz aktiviteleri saptamış ve bunların çoğunun endokitinaz olduğunu, bu kitinazların kitin polimerlerini rastgele hidroliz edebildiğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, tatlı patates bitkisinin yapraklarından izole edilen kitinazın optimum pH'sını 5.0, optimum sıcaklık değerini 25 °C olarak saptamışlardır. Chang ve ark. (1992) lahana kitinazı için optimum pH=5.0, optimum sıcaklık 50 °C, Lin ve ark. (1982) mısır için aynı pH değeri ve optimum sıcaklığı 40 °C olarak bildirmişlerdir.

4.11. Kitinaz Aktivitesi Üzerine Çeşitli Kimyasalların Etkisi

Metal iyonları, inhibitörler, deterjanlar ve şelatörlerin 1 mM-5 mM ve %1-%5 konsantrasyonları ile kitinaz ön inkübasyon yapıldıktan sonra aktivite tayini yapılarak, aktivatör-inhibitör etki ve etkisiz olan kimyasallar saptanmıştır. Kullanılan kimyasallar ve etkileri çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Bazı Kimyasalların Kitinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kimyasal	Konsantras.	Aktivite (%)
Kontrol		100
DMSO	%1	92
	%5	92
SDS	1mM	97
	5mM	93
EDTA	1mM	95
	5mM	93
1,10-Phenanthraline	1mM	90
	5mM	100
Etil Asetimidat	1mM	90
	5mM	80
Fenol Gliaksol	1mM	92
	5mM	104

N-Etil Melaimid *	1mM 5mM	106 89
PMSF *	1mM 5mM	106 81
Üre *	1mM 5mM	106 80
MgCl ₂	1mM 5mM	100 92
NaCl ₂	1mM 5mM	97 93
BaCl ₂ *	1mM 5mM	101 87
FeCl ₃	1mM 5mM	81 106
MnCl ₂ *	1mM 5mM	118 77
CuCl ₂	1mM 5mM	127 155
CoCl ₂	1mM 5mM	115 116
NiCl ₂	1mM 5mM	132 123
ZnCl ₂	1mM 5mM	118 106
KCl ₂	1mM 5mM	127 144
CaCl ₂	1mM 5mM	94 106
HgCl ₂	1mM 5mM	93 89
Na-Sülfid	1mM 5mM	98 96

*: 1 mM’da aktivite artışı, 5 mM’da aktivitede azalma

Enzim preparasyonu çeşitli kimyasallar ile farklı konsantrasyonlarda muamele edilmiş olup, aktivitedeki değişiklikler spektrofotometre ile ölçülmüştür. Enzim aktivitesi bazı kimyasalların etkisi ile yükselirken, bazılarının etkisi ile düşüş göstermiş bazı kimyasalların etkisi önemsiz kalmıştır.

Aktivite artışına neden olanlar;

FeCl₃ (%6), N-etil melaimid (%6), PMSF(%6), Üre (%6), Fenol-gliakso1 (%8), CoCl₂ (%16), ZnCl₂ (%18), MnCl₂ (%19), NiCl₂ (%32), KCl (%44), CuCl₂ (%56), ile aktivitede artış gözlenmiştir.

Aktivite azalmasına neden olanlar;

EDTA (%7), SDS (%7), HgCl₂ (%11), Etil-Asetimidat (%20) ile aktivitede inhibisyon saptanmıştır.

Önemli bir etki göstermeyenler;

DMSO (%92), MgCl₂ (%100), NaCl (%96), BaCl₂ (%102), Na-sülfıt (%98), CaCl₂ (%106), Phenantroline (%100) ile aktivitede dikkate değer bir etki gözlenmemiştir.

Lee ve ark. (2006) *Bacillus* sp. DAU101 suşuna ait kitinazı 1, 5, 10 mM farklı metal iyonları ve EDTA ile muamele etmişlerdir. Zn²⁺, Cu²⁺, ve Hg²⁺'nın güçlü inhibisyon yaptığı, Ni²⁺ ve EDTA ile %20-40 dolayında inhibisyon gözleendiği, 5mM Co²⁺ ile enzimin kitini hidroliz etme yeteneğinin 1.4 kat arttığı, Mg²⁺, Ca²⁺ ve Ba²⁺ ilavesi ile enzim aktivitesinin indüklendiği, Cs⁺, Na⁺, K⁺ ve Li⁺ varlığında enzimin etkilenmediğini bildirmişlerdir.

Dahiya ve ark. (2005), *Enterobacter* sp. NRG4'ten izole ettikleri kitinaz üzerine kimyasalların (1mM) etkisini araştırmışlar ve Mg²⁺, K⁺ ve Ca²⁺'ün aktivitede artış (sırasıyla; %13, %16, %18) gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca; 1 mM EDTA (%11,) Cu²⁺ (%9.7), Co²⁺ (%15), Ag⁺ (%22) ve Hg²⁺ (%72.2) ile inhibisyon

gözlemlemişlerdir. 100 mM Cu^{2+} (%98.3), Fe^{+3} (%90), Co^{2+} (%89), Fe^{2+} (%83.7) ile inhibisyon gözlenmiş, Cu^{2+} , Ag^{+} ve Hg^{2+} ile aktivite tamamen yok olmuştur.

Wen ve ark. (2002), *Bacillus* sp. NCTU2 suşundan izole ettikleri kitinaz üzerine çeşitli iyonların etkisini araştırmışlar ve Hg^{2+} ve Cu^{2+} 'ın güçlü inhibitör, her iki iyonun bir arada (10 mM) %95 aktivite kaybı, 10 mM Ca^{2+} varlığında $\approx$ %100 aktivite artışı, Ba^{2+} , Cr^{+3} , Mn^{2+} ve Mg^{2+} varlığında ise enzimin etkilenmediğini bildirmişlerdir.

Metal iyonlarının kitinazlar üzerine etkisi oldukça farklılık göstermektedir (Yuli ve ark., 2004);

Colletotrichum lindermuthianum kitinazı Co^{2+} ile (Patil ve ark., 2000), *Bacillus* MH-1 kitinazı ise Ca^{2+} ve Mn^{2+} ile (Sakai ve ak., 1998) aktive olmuştur.

Ag^{2+} *Aeromonas* kitinazı için aktivatör, *Bacillus* kitinazı için inhibitör (Ueda ve Arai, 1992; Tsujibo ve ark., 1998; Patil ve ark., 2000) etki yapmıştır.

Ni^{2+} ve Mn^{2+} *C. Lindermuthianum* kitinazı için (Patil ve ark., 2000) inhibitör, Cu^{2+} *P. aeruginosa* kitinazı için (Wang ve Chang, 1997) aktivatör etki yapmıştır.

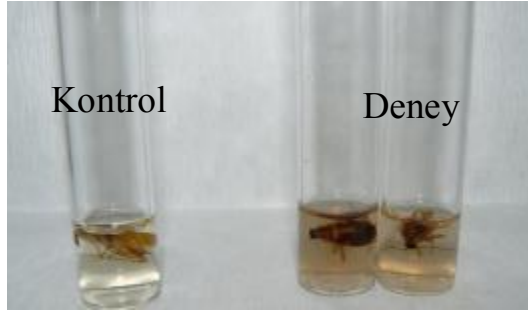
Bu çalışmada, **en yüksek aktivatör** etki gösteren metal iyonları sırasıyla Cu^{2+} (%56), K^{+} (%44) ve Ni^{2+} (%32) olmuştur. Aktivite artışı en az Fe^{3+} (%6), N-etil-melaimid (%6) ve PMSF (%6) ile gözlenmiştir.

Bazı metal iyonları; Ba^{2+} (101-87), Mn^{2+} (118-77) ve inhibitörler; PMSF (106-81), ÜRE (106-80), N-etil melaimid (106-89) 1 mM konsantrasyonda aktivitede artış, 5 mM'da ise inhibisyon etki göstermiştir.

En yüksek inhibisyon Etil-Asetimidat (%20) ve HgCl_2 (%11) ile en düşük inhibisyon EDTA (%7) ve SDS (%7) ile gözlenmiştir.

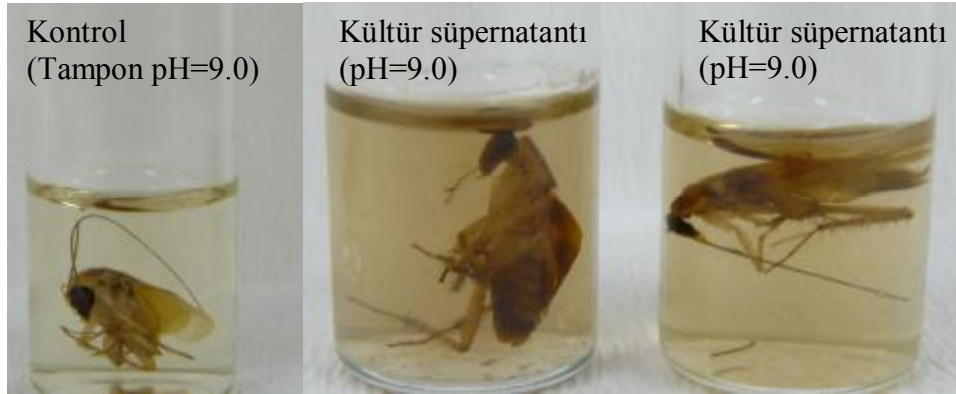
4.12. Kitinazın Kalorifer Böcekleri Üzerine Etkisi

Kalorifer böcekleri (*Blatella germanica*, Ordo: Orthoptera, Fam: Blatellidae) *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 suşundan elde edilen kültür süpernatantı (pH=9.0) ile 50°C'de 1 hafta boyunca muamele edilmiştir (Şekil 4.11)



Şekil 4.11. Klorifer böceklerinin kitinaz enzimi ile muamelesi sonucu 1. günde makroskopik görünüm

İlk günde ve 5. güne kadar herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. 5. günden sonra klorifer böceklerinde bacaklarda ve kanatlarda kopmalar meydana gelmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık olan 110 °C’de inkübasyon gerçekleştirilemediği için parçalanma bu düzeyde kalmıştır.



Şekil 4.12. Klorifer böceklerinin kitinaz enzimi ile muamelesi sonucu 5. günde makroskopik görünüm

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Kitin ve kitosan kabuklularda bulunur. Bu moleküller kalsiyumu bağlar ve proteinlerle kovalent bağlar oluştururlar. Proteinler diğer karbonhidratlar için bağlayıcı görev yapar. Kitin ve kitosan N-asetil glükozamin ve glükozaminin β -1-4 bağları ile birbirine bağlanmış kopolimerleridir. Bu kopolimer eğer %7 den daha az azot ihtiva ediyorsa *kitin* olarak tanımlanır. *Mucor rouxii*'den elde edilen kitin deaçilaz (deacylase), kitinin, kitosan ve asetik asite hidrolizini katalizler. Çözünebilir kitosanın moleküler ağırlığı yüzbinlerce hatta iki milyon dalton kadar olabilir (Zikakis, 1998).

Kitinaz (EC 3.2.1.14), canlı organizmaların pek çoğunda (bakteri, bitki, mantar, memeli ve hatta insan) bulunan, N-asetil glükozamin (GlcNAc) rezidülerinin lineer bir polimeri olan kitini hidroliz eden, bir enzimdir. Kitin oldukça zor çözünebilen bir biopolimerdir ve doğada selülozdan sonra en fazla bulunur. Kitin derivatları (oligomer ve monomerleri) geniş kullanım alanlarına sahiptir. Kitin oligomerleri ve kitosanın çok önemli fizyolojik fonksiyonları bulunmaktadır. Bunlar; anti-tümör aktivite, immün sistemi güçlendirme, farelerde bazı patojenlerle oluşan enfeksiyonlara karşı koruma etkisi, anti-fungal ve anti-mikrobiyal aktivite gibi etkililerdir. Bu yüzden; kitinin hidrolizi sonucu oligomer ve monomerlerin elde edilmesi ile alakalı prosesler geliştirmek önemli bir biyoteknolojik uygulamadır. Ayrıca çevreye hiçbir zararı olmayan biopestisid üretiminde, kitin içeren böcekler ve patojen mantarlarla mücadele amacıyla kitinazların kullanılması, medikal anlamda patojen mantarların kitinazlarla tedavi edilme olasılıkları mikrobiyal kitinazların önemini giderek artırmaktadır (Mauch ve ark., 1998; Suzuki ve ark., 2001; Guo ve ark., 2004; Chang, ve ark., 2007).

Kitinazlar yüksek organizasyonlu bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Bu enzim; domates, soya fasülyesi, buğday kepeği gibi bitkilerden izole edilmiştir ve *Streptomyces* (özellikle *S. griseus*) *Serratia* ve *Aeromonas* türleri potansiyel üreticileridir. *S. griseus*'tan izole edilen kitinaz enziminin moleküler ağırlığı 35,000 Da, optimum pH'sı 8.0'dır. pH 6.0 ile 8.0 aralığında 37°C'de stabil olan enzim yüksek sıcaklıklarda inaktivasyona

uğramaktadır. Kitinaz diğer karbohidrazilara benzer şekilde 3 enzim kompleksi ihtiva eder; bunlar; **endokitinaz, ekzokitinaz ve kitobiazdır** (Dubourdieu ve ark., 1985).

Ticari kitosanazlar fermentasyon yoluyla *Bacillus pumilis*'ten (Chitosanase BP [MJ]) üretilmiştir. Bu enzim glükozamin polimerlerini içeren mikroorganizmaların duvarını parçalama yeteneğindedir (mantarlar kitin duvar içerir). Enzimin optimum pH aralığı 5-6.5 ve optimum sıcaklığı ise 40-60 °C şeklindedir. Aktivitesi oldukça yüksek başka bir enzim *Aeromonas hydrophilia* subsp. *anaerogenes* kültüründen üretilmiştir [GO] (McClery ve Matheson, 1987). ([MJ], [GO]: Üretici firmalar)

Günümüzde mikrobiyal orijinli enzimler tekstil, tıp, deri endüstrisi, biyoteknolojik uygulamalar, biyolojik ve kimyasal atıkların geri dönüşümü vb çok çeşitli alanlarda etkin şekilde kullanılmaktadır. Mikrobiyal orijinli katalizörlerin (enzimlerin) tercih edilmesinin en önemli sebepleri; doğada çok çeşitli enzimi sentezleyen, her türlü mikroorganizmanın var oluşu, üretilmelerinin kolaylığı, elde edilen enzimlerin etkinliğinin kimyasal olarak sentezlenen enzimlerden çok daha yüksek aktivite göstermeleri, yüksek sıcaklık ve pH koşullarına dayanıklılıkları sayılabilir.

Kitinaz enzimini üreten **mikroorganizma** suşlarının doğadan izole edilmesini endüstriyel açıdan ele aldığımızda;

a-Yüksek düzeyde enzimatik aktiviteye sahip türlerin seleksiyonu ve buna bağlı olarak insektisidal aktivitenin tesbiti ile özellikle kitin bakımından zengin atıkların biyolojik olarak parçalanması önemli bir ekolojik kazanç olabilecektir.

Böcek pestisidleri şeklinde, biyolojik kontrol ajanları olarak kullanılabilirlerdir.

b-Yüksek kitinaz aktivitesi gösteren mikroorganizma türlerinin seleksiyonu ve identifikasyonu gerçekleştirildiği takdirde, bunların enzim üreticileri olarak kullanılmaları veya atık materyallerden biomass üreticisi olarak yararlanılmaları mümkün olabilecektir. Kimyasal olarak hazırlanmış ve satışa sunulmuş, halen kullanılmakta olan pek çok insektisidin insan ve hayvan sağlığı üzerinde yaratmış olduğu birtakım sağlık problemleri kısmen çözümlenebilecek, özellikle teratojenik ve

kanserojenik özellik taşımayan **biopestisidlerin** üretilebilmesi söz konusu olabilecektir.

c-Bitki patojeni olan funguslarla biyolojik savaş yapılabilir, kitinaz üreten mikroorganizmalar kitinaz geni bakımından önemli bankalar olarak kullanılabilir.

d-Özellikle tıpta, mantar enfeksiyonlarında, sağlık için hiç bir toksik etkisi olmayan topikal kullanıma uygun anti-fungal preparatların üretilmesinde mikrobiyal orjinli kitinaz kullanılabilir.

Vaidya ve ark. (2003) daha önce yapmış oldukları çalışmada; *Alcaligenes xylosoxydans*'tan izole ettikleri kitinazın *Fusarium udum* ve *Rhizoctonia bataticola*'nın üremesini, *Aspergillus niger*'in spor germinasyonunu ve hifsel gelişimini tamamen inhibe ettiğini, *Penicillium janthinellum* P9'dan elde edilen kitinazın *Mucor plumbeus* ve *Cladosporium caladosporioides* misellerine ciddi hasar verdiğini, *Fusarium chlamydosporum* kitinazının *Puccinia arachidis*'in germinasyon tüpleri ve spor duvarını lizi ettiğini, *Alc. xylosoxydans*'ın fungal hücre duvarını tamamen degrade ettiğini bildirmişlerdir.

Chang ve ark. (2007), *Bacillus cereus*'un bitki büyümesini stimüle edici bileşiklerin, deniz atıklarından kitinin kullanılmasıyla elde edildiğini bildirmektedirler.

Kitin ve kitin derivatları biyolojik aktivitelerinin çok fazla olması ve biyoteknolojik etkinliklerinin yüksek olması nedeniyle önemli biyomoleküllerdir. Kitin degradasyonunu gerçekleştiren kitinazlar bakteri, mantar, *Actinomyces*, maya, bitki, protozoa, sölenter, nematod, yumuşakça, artropoda ve hatta insanda bulunan doğanın hazinelerinden biridir (Bhushan, 2000).

Kitinazlar günümüzde önem arzeden araştırma konularından biridir, çünkü; fungal patojenlerin biokontrolünde, zararlı böcekler ile biyolojik savaşta, maya ve funguslardan protoplast/sferoplast hazırlanmasında, kitin atıklarının biokonversiyonu ile tek hücre proteini ve etanol üretiminde, gübre eldesinde, kitinaz aktivitesinin transglükolizasyonu ile spesifik boyutlarda oligomerler eldesinde, medikal olarak kullanımı çok önem arzeden glikozamin üretilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca kitinazların endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda tercih edilmesi; maliyetinin

düşük olması, özellikle raf ömrünün uzun olması (saklama koşullarında stabil), immobilizasyon ile enzim özelliklerinin geliştirilebilirliği vb sebepler sayılabilir (Bhushan, 2000).

Bu araştırmada izole edilen *Bacillus* HBK-51 suşu biyokimyasal testler yağ asiti analizleri ve 16 S RNA analizlerine göre ***Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstakii*** olarak tanımlanmıştır. *Bacillus thuringiensis* biopestisid olarak yıllardır kullanılmaktadır (Thamthiankul ve ark., 2001). Ayrıca kitinaz üretiyor olması, böceklerle karşı toksisite artışına neden olabilecektir. Wiwat ve ark. (1999), *Bacillus circulans* No.4.1 suşunun kitinaz ürettiğini bu kitinazın geniş pH aralığında (6.0-12.0) kitini hidroliz ettiğini, eğer kitinaz kodlayan gen *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*'ye aktarılırsa böceklerle biyolojik savaşta ciddi toksisite artışına sebep olacağını bildirmişlerdir.

Bu araştırmada kitinaz üreticisi olarak *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 suşu kitinli (%1 kolloidal kitin) besiyerinde üretilmiş ve süpernatant filtre edildikten sonra, etanol presipitasyonu yöntemi ile çöktürülmüştür. Kısmi saflaştırma ile elde edilen enzim farklı sıcaklık ve farklı pH değerlerinde standart enzim aktivite denemesine tabi tutulmuştur. Enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın 110 °C, optimum pH'nın ise 9.0 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7, 4.9).

Sıcaklık stabilite denemeleri için enzim farklı sıcaklıklarda 3 h ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre içerisinde 90 °C'de en yüksek aktivite göstermiştir. 110 °C'de %96 kalan aktivite saptanmış olması termostabilite için oldukça önemli ve yüksek bir değerdir. Yuli ve ark. (2004) *Bacillus* sp. 13.26 kitinazının 70 °C'de 5 saatlik sürede stabil kaldığını ve bakterial kitinazlar için bunun ilk rapor edilmiş sonuç olduğunu bildirmişlerdir bu durum arkea kitinazlarını geride bırakmıştır. **Bu termostabilitenin; yoğun elektrostatik interaksiyon (ör; tuz köprülerinin formasyonu), hidrojen bağları, hidrofobik interaksiyonlar, intramoleküler disülfid bağları ve enzim molekülünün sıkı paketlenmesinden olabileceği belirtilmiştir** (Adams ve Kelly, 1998).

pH stabilitesi sonuçlarına bakıldığında, aktivitenin pH 9.0 aralığına kadar yükseldiği ve 9.0'dan sonra sabitlendiğini görülmektedir (Şekil 4.10). Bu sonuçlara göre termostabil, alkali, HİPERTERMOFİL bir enzim olarak tanımlanmıştır.

Ohishi, (1996) ve Ueda ve Arai, (1992) mikrobiyal kitinazların çok yüksek pH aralıklarında aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

SDS-PAGE ile moleküler ağırlık hesabı yapılmış ve 125 ve 50 kDa boyutlarında 2 ayrı band içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Busaya ve ark. (2005) *Streptomyces fradiae*'den izole ettikleri kitinazın 26 ve 43 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Birçok araştırmacı (Chanpen ve ark., 1999; Lee ve ark., 2006; Kim ve ark., 2007) kitinazların, 26, 30, 36.5, 38, 43, 45, 75, 110, 143, 200 kDa moleküler ağırlığında farklı büyüklüklerde olduğunu bildirmişlerdir.

Kitin ve derivatlarının, biyolojik önemi gereği, bu tarz çalışmaların devam etmesi, planlanacak çalışmalarda, kitinazın antifungal aktivite, böcekler üzerindeki etki, enzimin hipertermofilite özelliğinin moleküler mekanizması, farklı mikroorganizmalardan kitinaz üretilmesi, kitinazların farklı kitin derivatlarını (glikol kitin, glikol kitosan, CMC, koloidal kitin, çözünebilir kitosan vb) hidroliz etme yeteneği ve düzeyi, hatta kimyasal insektisidler ile kitinazın böcekler üzerindeki etkisini kıyaslayan detay çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- ADAMS, M.W.W., KELLY, R.M. 1998. Finding and using hyperthermophilic enzymes. *TIBTECH*, 16: 329-32.
- AEHLE, WOLFGANG. 2004. Enzymes in Industry. Production and Applications. WILEY-VCH Verlag GmbH &Co. KGaA. Weinheim.
- ALLANS, C., ATMAN, L.C., BESSINGER, R.E., GOSH, D.K., VE NEOGI, S. 1984. Biomedical applications of chitin and chitosan. In chitin, chitosan and related enzymes. Ed. J.P.Zikakis, Academic Pres. Inc., Orlando, Sandiego, Newyork, p:19, ISBN:0-12-780950-3.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. and LIPMAN, D.J. 1990. basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.
- ANONYMOUS, 1978. Mikrobiyologisches Handbuch, E. Merck, Darmstad.
- BALOWS, A., HAUSLER, W.J. and HERMANN, K.L. 1991. Manuel of Clinical Microbiolgy, ed. 5. Washington, DC: American Society for Microbiology, 279, 443, 450, 1248.
- BARON, E.J. and FINEGOLD, S.M. 1990. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, ed. 8. Philedelphia: CV Mosby, 378-394.
- BARON, E.J., FINEGOLD, S.M. and BAILEY, S. 1990. Diagnostic Microbiology, ed 8. St. Louis: CV Mosby, 494.
- BASSLER, B.L., YU, C., LEE, Y.C. VE ROSEMAN, S. 1991. Chitin utilization by marine bacteria: Degradation and catabolism of chitin-oligosaccarides by *Vibrio furnissi*. *J. Biol. Chem.* **266**: 24276-24286.
- BERENBAUM, M. (1980). Adaptive significance of midgut pH in larval lepidoptera. *Am. Nat.*, **115**: 138-146.
- BHUSHAN, B. 2000. Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Journal of Applied Microbiology*, **88(5)**: 453-459.
- BHUSHAN, B. and HOONDAL, G.S. 1998. Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Biotechnol. Lett.* **2**: 157-159.

- BHUSHAN, B. and HOONDAL, G.S. 1999. Effect of Fungicides, Insecticides and Allosamidin on a Thermostable Chitinase from *Bacillus* sp. BG-11, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **15**: 403-404.
- BOLLAG, D.M., and EDELSTEIN, J., ROZYCKI, M.D. 1996. Protein Methods, VILLEY-LISS Press. p: 68-71, 107-128.
- BONNIE, S.D. 1990. Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques. Sec. Ed. USA.
- BROWN, L.R., BROWN, S.K. VE LADNER, C.M. 1981. Biological treated shrimp waste as a seed treatment control of pathogenic fungi. In Developments in Industrial Microbiology, Proceedings of the 38th. General meeting of the society of the for industrial microbiology. **23**: 513-519.
- CANTAROW, A., SCHEPARTZ, B. 1962. Biochemistry, ed 3. Philadelphia: WB Saunders, **242**: 271-274.
- CHANG, C.T., LO, H.F., WU, C.J., and SUNG, H.Y. 2007. Purification and properties of chitinase from cabbage. *Biochem. Int.* **28**: 707-715.
- CHANPEN, W., PATCHARAPON, S., VE AMARAT, B. 1999. Purification and characterisation of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1. *Current Microbiology*. **39**: 134-140.
- CHEN, J. and WENG, H. 1983. The performance of immobilized glucose-isomerase supported by shrimp chitin in various types of reactors. *Biotechnology and Bioengineering*. **25**: 725-733.
- CHEN, W.P. and KUO, T.T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **21**: 2260
- CHRISTENSEN, W.B. 1946. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bacteriol*, **52(4)**: 461-466.
- CLARK, W.M. and LUBS, H.A. 1915. The differantiation of bacteria of the Colon-*Aerogenes* family by the use of indicators. *J. Infect. Dis.* **17(1)**: 160-173.
- CODY, RM. 1990. Screening Microorganisms for chitin hydrolysis and production of ethanol from amino sugars. *Biomass*. **21**: 285-295.

- COWAN, S.T. 1974. Cowan & Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, ed 2. Cambridge: Cambridge University Press, **12**: 148-162.
- ÇETİN, E.T. 1978. Pratik Mikrobiyoloji, İstanbul Üniversitesi, 2. Baskı. Menteş Matbaası. İstanbul.
- DAHIYA, N., TEWARI, R., TIWARI, R., and HOONDAL, G.S. 2005. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its Purification, Characterization and Reaction Pattern, *Electronic Journal of Biotechnology*, **8(2)**: 134-145..
- DARLING, C.L. 1975. Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material. J. Clin. Microbiol. **1(2)**: 171-175.
- DAVIS, B.D. 1990. Nutrition; energy, membrane transport; chemotaxis. Davis et al. (eds). Microbiology, J.B. Lippincott Co, Philadelphia, 65-90.
- DENIZCI, A.A., KAZAN, D., ABELN, E.C.A., and ERARSLAN, A. 2004. Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. Journal of Applied Microbiology, **96**: 320-327.
- DUBOURDIEU, D., DESPLANGES, C., VILLETIAZ, J.-C., and RIBEREAU-GAYON, P. 1985. Carbonhydr. Res. **144(2)**: 277.
- DUNBAR, B.S. 1990. Two-Dimensional electrophoresis and Immunological techniques. 2th ed.
- FAVALORO, J., TREISMAN, R., KAMEN, R., in GROSMAN, L., and MOLDAVE, K. (eds). 1980. Methods in Enzymology. Vol: **65**, Academic Press, New York, p: 718.
- FLACH, J., PLET, P.E., JOLLES, P. 1992. What's the new in chitinase research? Experientia, **48**: 701-716.
- FOLDERS, J., TOMMASSEN, L., LOON, C., VE BITTER, W. 2000. Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **182**: 1257-1263.

- FRANKOWSKI, J., LORITO, M., SCALA, F., SCHMID, R., BERG, G., BAHL, H. 2001. Purification And Properties of Two Chitinolytic Enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48, Arch Microbiol, **176**: 421-426.
- FRIDOVICH, I. 1978. The biology of oxygen radicals. Science, **201**: 875-880.
- GAAL, O., MEDGYESI, G.A., and VERECZKEY, L. 1980. Electrophoresis in separation of biological macromolecules. A Wiley-Interscience Publication, New York.
- GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., WILLIS, A.W., and KRIEG, N.R. 1994. Methods for general and molecular bacteriology. Printed in USA.
- GOHEL, V., VYAS P., and CHATPAR, H.S. 2004. Activity Staining Method Of Chitinase On Chitin Agar Plate Through Polyacrylamide Gel Electrophoresis, African Journal of Biotechnology **4**: 87-90.
- GOMES, R.C., SEMEDO, L.T.A.S., SOARES, R.M.A., ALVIANO, C.S., LINHARES, L.F., and COELHO, R.R. 2000. Chitinolytic activity of *Actinomycetes* from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Letters in Applied Microbiology*, **30(2)**: 146-147.
- GOODENOUGH, P.W., in TUCKER, G. A., and WOODS, L.F.J. (eds). 1995. Enzyme in Food Processing, 2nd ed., Blakie Academic & Professional (imprint of Chapman & Hall), New York, p: 41.
- GOODEY, G.W. 1990. The ecology of chitin degradation. Adv. Microbial Ecol. **11**: 387-430.
- GUO, S-H., CHEN, J-K., and LEE, W-C. 2004. Purification and characterization of extracellular chitinase from *Aeromonas schubertii*. *Enzyme and Microbial Technology*, **35**: 550-556.
- HARDY, K.G. 1993. Plasmids, The Practical Approach Series, pp. 99-100.
- HAYWARD, N.J. 1941. Rapid identification of *Cl. welchii* by the Nagler reaction. Br Med J. **1**: 811-814.
- HEBEDA, R. E., and HUI, Y. E. (ed). 1992. Encyclopedia of food and science technology, Wiley, New York, **4**: 2490.
- HOLT, J.D. 1993. Manuel of Determinative bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

- HOU, W-C., CHEN, Y-C., and LIN, Y-H. 1998. Chitinase activity of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam var. Tainong 57). *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **39**: 93-97.
- JEUNIAUX, C. 1966. Chitinase. *Methods Enzimol.* **8**: 644-650.
- JEYASEELAN, K., CHUNG, M.C.M., and KON, O.L. 1987. Genes and Proteins. Printed in the United States of America.
- JOHN, F.K. 1987. Enzyme Technology (H.J. REHM., REED, G.), *Biotechnology*, **7**: 37-62.
- KALISZ, H. M. 1988. Microbial enzymes. Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology, Springer, Berlin Heidelberg, New York, **36**: 3-61.
- KIM, H-S., TIMMIS, K.N., and GOLYSHIN, P.N. 2007. Characterization of a chitinolytic enzyme from *Serratia* sp. KCK isolated from kimchi juice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**: 1275-1283.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D. and JANDA, W.M. 1992. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, ed. 4. Philadelphia: JB Lippincott, 447, 449, 459, 548.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D. and JANDA, W.M. 1997. Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology, ed. 5. Philadelphia: JB Lippincott, 270-283.
- LEAH, R., TOMMERUP, H., SVENDSN, IB., MUNDY, J. 1995. Biochemical and molecular characterisation three barley seed proteins with antifungal properties. *J. Biol. Chem.* **266**: 1564-1573.
- LEE Y.S., PARK I.H., YOO J.S., CHUNG S.Y, LEE Y.C., CHO Y.S., AHN S.C., KIM C.M. and CHOI Y.L. 2006. Cloning, Purification, and Characterization of Chitinase From *Bacillus* sp. DAU101, *Bioresource Technology*.
- LIN, Z.F., WU, D., LUO, A., and ZHANG, W. 1982. Chitinase from seed of *Zea mays* and *Coix lachrymajobi* L., purification and some properties. *Process Biochem.*, **27**: 83-88.

- LIU, M., CAI, Q.X., LIU, H.Z., ZHANG, B.H., YAN, J.P., and YUAN, Z.M. 2002. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *Journal of Applied Microbiology*, **93(3)**: 554-561.
- LOPEZ-MEZA, J.E., FEDERICHI, B.A., POEHNER, W.J., MARTINEZ-JUSTILLO, A.M. and IBARRA, J.E. 1995. Highly mosquitocidal isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae* and entomocidous from Mexico. *Biochemical and Systematic Ecology*. 23, 461-468.
- MacFADDIN, J. F. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Third. Ed. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.
- MADIGAN, T.M., MARTINKO, M.J., and PARKER, J. 1997. Brock Biology of Microorganisms. International Edition, 8th Ed.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., and SAMBROCK, J. 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York.
- MAUCH, F., MAUCH-MANI, B. and BOLLER, T., 1998. Antifungal Hydrolases Pea Tissue. Inhibition of Fungal Growth by Combination of Chitinases and Glucanases. *Plant Physiology*, **88**: 325-333.
- McCLERY, B.V., and MATHESON, N.K. 1987. *Advances Carbonhydr. Chem.* **44**, 147.
- McCLUNG, L.S., and TOABE, R. 1947. The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnosis of *Clostridium sporogenes* and certain species of the gangrene and botulinum groups. *J. Bacteriol.* **53(2)**: 139-147.
- McCREATH, K.J. and GOODAY, G.W. 1992. A rapid and sensitive microassay for determination of chitinolytic activity. *J. Microbiol. Methods*, **14**: 229-237.
- MULLER, H.E. 1986. Production and degradation of indole by gram-negative bacteria. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Ser A*. **261**: 1-11.
- MURPHY, J.M., STUART, O.M. and REED, F.I. 1952. An evaluation of the CAMP test for the identification of *Streptococcus agalactiae* in routine mastitis testing. *Cornell Vet.* **42**: 133-147.

- MUZARELLI, R.A.A. 1977. Chitin: Industrial production and applicationed. Pergamon Pres, Newyork. PP. 207-213.
- MUZZARELLI, R.A.A. and PETER, M.G. 1997. Chitin Handbook, European Chitin Society, Atec, Grottammare, Italy.
- MUZZARELLI, R.A.A., JEUNIAUX, C., GOODAY, G.W. 1986. Chitin in nature and technology. Pergamon Press, Newyork, pp: 39-50.
- NAWANI, N.N., and KAPADNIS, B.P. 2004. Production dynamics and characterization of chitinolytic system of *Streptomyces* sp. NK1057, a well equipped chitin degrader. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **20**: 487-494.
- OHISHI, K., YAMAGISHI, M., OHTA, T., SUZUKI, M., IZUMIDA, H., SANO, H., NISHIJIMA, M., and MIWA, T. 1996. Purification and properties of two chitinases from *Vibrio alginolyticus* H-8. *J. Ferment Bioeng.*, **82**: 598-600.
- OKE, O.L., TALAYI, S.O. and UMOCH, I.B. 1978. The possible use of chitin and chitosan as animal feed. PP.327-332. In proceedings of the first Int. Conference on chitin/chitosan.
- PATIL, R.S.V., GHORMADE, M., DESHPANDE, M.V. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb. Technol.*, **26**: 473-483.
- PERRAKIS A., TEWS I., DAUTER Z., OPPENHEIM A.O., CHET I., WILSON K.S., and VORGAS C.E. 1994. Crystal Structure of a Bacterial Chitinase at 2.3 °A Resolution. *Structure*, **2**, 1169.
- PHILLIPS, E.A., TAPSALL, J.W. and SMITH, D.D. 1980. Rapid tube CAMP test for identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B). *J. Clin. Microbiol.* **12(2)**: 135-137.
- RAMIREZ M.G., AVELIZAPA I.L.R., AVELIZAPA N.G.R. and CAMARILLO R.C. 2003. Colloidal Chitin Stained With Remozal Brilliant Blue R, A Useful Substrate to Select Chitinolytic Microorganisms and to Evaluate Chitinases, *Journal of Microbiological Methods* **56**: 213-219
- REVAH-MOISEEV, S. and CARROAD, P. 1981. Conversion of the enzymatic hydrolisad of shell fish waste chitin to single cell protein. *Biotechnology*

- and Bioengineering*, **23**: 1067-1078.
- ROBERTS, W.K. and SELITRENNIKOFF, C.P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gene Microbiol.* **134**: 169-176.
- ROJAS-AVELIZAPA, CRUS-CAMARILLO, R., GUERRERO, M.I., RODRIGESVAZGUEZ, R., and IBARRA, J.E. 1999. Selection and characterisation of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis* able to grow in shrimp waste media. *World J. Microbiol. and Biothechnol.* **15**: 299-308.
- SAGINUR, R., CLECNER, B., PORTNOY, J. and MENDELSON, J. 1982. Superoxol (catalase) test for identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* **15(3)**: 475-477.
- SAKAI, K., YAKOTA, A., KUROKAWA, H., WAKAYAMA, M., and MORIGUCHI, M. 1998. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of *Bacillus noble* strain MH-1 isolated from chitin containing compost. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64(9)**: 3340-97.
- SAMBROCK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. 1988. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor.
- SHIH, N-J.R. and McDONALD, K.A. 1997. Purification and Characterization of Chitinases from Transformed Callus Suspension Cultures of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. *J.Fermentation and Bioengineering*, **84(1)**: 28-34.
- SHUBAKOV, A.A. and KUCHERYAVYKH, P.S. 2004. Chitinolytic Activity of Filamentous Fungi, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **40(5)**: 445-447.
- SRIVASTAVA, R.A.K. 1987. Purification and chemical characterization of thermostable amylase produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **9**: 749-754.
- STEIJN, G.J.V., AMERONGEN, N.A.V., VEERMAN, E.C.I., KASANMOENTALIB, S. and OVERDIJK, B. 2002. Effect of Periodontal Treatment on The Activity of Chitinase in Whole Saliva of Periodontitis Patients, *J Periodont Res*, **37**: 245-249.

- STEPHENS, N.L., BOUGH, W.A., BEUCHAT, L.R. and HATTON, E.K. 1976. Preparation and evaluation of two microbial media of shrimp heads and hulls. *App. And Environ. Microbiol.* **3**: 1-16.
- STRYER, L. 1988. Biochemistry. Third Ed. W.H. FREEMAN AND COMPANY/NEWYORK.
- SURESH, P.V., and CHANDRASEKARAN, M. 1999. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. *Process. Biochem.*, **34**: 257-267.
- SUZUKI, K., SUZUKI, M., TAYIYOJI, M., MIKAIDOU, N., and WATANABE, T. 1998. Chitin-binding protein (CBP-21) in the culture supernatant *Serratia marsescens*. 2170. *Bio. Sci. Biothechnol. Biochem.* **62**: 128-135.
- TANTIMAVANICH, S., PANTUWATANA, S., BHUMIRATANA, A., and PANBANGRED, W. 1998. Multiple chitinase enzymes from a single gene of *Bacillus licheniformis* TP-1. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **85(3)**: 259-265.
- TEMİZKAN, G. ve ARDA, N. 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- THAMTHIANKUL, S., SUAN-NGAY, S., TANTIMAVANICH, S., and PANBANGRED, W. 2001. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. pakistani. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 395-401.
- TOMASSEN, J., FILLLOUX, A., BALLY, M., MURGIER, M. and LAZDUNDSKI, A. (1992). Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS. Microbiol. Rew.* **103**: 73-90.
- TSUJIBO, H., YOSHIDA, Y., MIYAMOTO, K., IMADA, C., OKAMI, Y., INAMORI, Y. 1992. Purification, properties, and partial amino acid sequence of chitinase from a murine *Alteromonas* sp. O-7. *Can. J. Microbiol.*, **38**: 891-897.
- UCHIDA, Y., IZUME, M.A., and OHTAKARA, A. 1989. Preparation of chitin oligomers with purified chitosanase and its applications. PP. 373-382. In Chitin and Chitosan. Eds. G.Skjak-Braek, T. Anthonsen and P. Sandford, Elsevier applied science LTT, London and Newyork. ISBN 1-85166395-9.

- UEDA, M., and ARAI, M. 1992. Purification and some properties of chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**: 460-464.
- USTAÇELEBİ, Ş. 1999. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, sayfa: 411-412, 624-625.
- VAIDYA, R., ROY, S., MACMIL, S., GANDHI, S., VYAS, P., and CHHATPAR, H.S. 2003. Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes xylosoxydans*. *Biotechnology Letters*, **25**: 715-717.
- VESTERBERG, O. 1993. A short history of electrophoretic methods. *Electrophoresis*, **14**: 1243-1249.
- WALKER, J., WINDER, J., and STARKEY, M. 1988. Introductory Workshops on techniques in molecular biology. Hatfield Polytechnic. Hatfield, Herts.
- WANG, S.L., and CHANG, W.T. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(2): 380-386.
- WATANABE, T., OYANAGI, W., SUZUKI, K., OHNISHI, K., and TANAKA, H. 1992. Structure of gene encoding chitinase -D, *Bacillus circulans* Wild type 12, and possible homology of the enzyme to other procaryotic chitinase and class-3 plant chitinases. *J.Bacteriol.* **174**: 408-414.
- WEN, C.M., TSENG, C.S., CHENG, C.Y., and LI, Y.K. 2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **35**: 213-219.
- WISEMAN, A. 1987. Handbook of Enzym Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry. p:274-373.
- WIWAT, C., SIWAYAPRAHM, P. and BHUMIRATANA, A. 1999. Purification and Characterization of Chitinase From *Bacillus circulans* no.4.1., *Current Microbiology*, **39**: 134-140.
- YABUKI, M., MIZUSHINA, K., AMATATSU, T., ANDO, A., FUJII, T., SHIMADA, M., YAMASHITA, M. 1986. Purification and characterization of chitinase and chitobiose produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**:25-38.

- YALPANI, M., and PANTALEONE, D. 1993. An Examination of The Unusal Susceptibilities of Aminoglycans to Enzymatic Hydrolysis, Elsevier Science.
- YILDIRIM, A., BARDAKÇI, F., KARATAŞ, M. Ve TANYOLAÇ, B. 2007. Moleküler Biyoloji, Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın no:2.
- YULI, E.P., SUHARTONO, T., RUKAYADI, Y., HWANG, J.K., and PYUN, R.Y. 2004. Characteristics of Thermostable Chitinase Enzymes From the Indonesan *Bacillus* sp. 13.26, *Enzyme and Microbial Technology* **35**: 147-153.
- ZEMAN, N.W. and McCREA, J. M. 1985. α -Amylase Production Using a Recombinant DNA Organism. *Cereal Foods World*, **30 (1)**: 777-780.
- ZIKAKIS, J. 1998. *Methods in Enzymology*, ACS Symposium Ser. **389**: 116.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Hatay'ın İskenderun ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi İskenderun'da tamamladım. 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümünü bitirdikten sonra, 2005 yılında yine Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilimdalında master programına başladım.