



**L- ASPARAGİNAZ ÜRETEN
MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU
ve KARAKTERİZASYONU**

Emine GÖKÇE

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR**

2019

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**L- ASPARAGİNAZ ÜRETEN MİKROORGANİZMALARIN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Emine GÖKÇE

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Genel Biyoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2019**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

L- ASPARAGİNAZ ÜRETİM MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU

Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR danışmanlığında, Emine GÖKÇE tarafından hazırlanan bu çalışma, 03/09/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mehmet Nuri AYDOĞAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **03.10./2019** tarih ve **...39.../...74...** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

L-ASPARAGİNAZ ENZİMİNİ ÜRETEN MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Emine GÖKÇE

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

L-asparaginaz, kanser tedavisinde kullanılan önemli bir terapötik enzimdir. L-asparaginaz üretimi için daha verimli mikrobiyal kaynak bulmak oldukça önemlidir. Çalışmamızda L-asparaginaz enzimi üreten mikrobiyal kaynaklar, farklı hayvansal organizmaların (insan, sığır, tavuk, balık, böcek ve toprak solucanı) sindirim sisteminden izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin L-asparaginaz üretme yetenekleri; fenol kırmızısı ve L-asparagin aminoasidi içeren M9 ortamında test edilmiştir. İnsan dışkılarından izole edilen WC, sığır sindirim sisteminden izole edilen E6 ve toprak solucanından izole edilen SC4'ün L-asparaginaz aktivitesi pozitif özellik göstermiştir. İzolatlar için yapılan optimum koşullar; karbon kaynağı glikoz, glikoz miktarı 2 g/L, pH 7.0, inkübasyon süresi 48 saat olarak belirlenmiş ve elde edilen aktivite değerleri; E6 147 U/ml, WC 165 U/ml ve SC4 150 U/ml şeklindedir. Bu bakterilerin fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. 16S DNA analizlerine göre bu bakteriler; (WC) MN420918 *Bacillus atrophaeus*, (E6) MN420916 *Bacillus subtilis* ve (SC4) MN420917 *Bacillus pumilus*'tur. Ürettikleri L-asparaginaz enzimi kısmi olarak saflaştırılmış ve molekül ağırlıkları SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Kısmi saflaştırılmış L-asparaginazın molekül ağırlıkları; WC (MN420918 *Bacillus atrophaeus*); 100 kDa, E6 (MN420916 *Bacillus subtilis*); 35 kDa ve SC4 (MN420917 *Bacillus pumilus*); 75 kDa olarak belirlenmiştir.

2019, 68 sayfa

Anahtar Kelimeler: L-asparaginaz, *Bacillus*, sindirim sistemi florası, SDS-PAGE

ABSTRACT

MS Thesis

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS PRODUCING L-ASPARAGINASE ENZYME

Emine GÖKÇE

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
General Biology Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

L-asparaginase is an important therapeutic enzyme used in the treatment of cancer. It is important to find a more efficient microbial source for the production of L-asparaginase. In our study, microbial sources producing L-asparaginase enzyme were isolated from the digestive system of different animal organisms (human, cattle, chicken, fish, insect and soil worm). The ability of isolated bacteria to produce L-asparaginase; phenol red and L-asparagine amino acid. L-asparaginase activity of WC isolated from human feces, E6 isolated from bovine digestive system and SC4 isolated from soil worm showed positive properties. Optimum conditions for isolates; carbon source glucose, glucose amount 2 g / L, pH 7.0, incubation time was determined as 48 hours and obtained activity values; E6 147 U / ml, WC 165 U / ml and SC4 150 U / ml. Physiological, morphological and biochemical properties of these bacteria were determined. According to 16S DNA analysis, these bacteria; (WC) MN420918 *Bacillus atrophaeus*, (E6) MN420916 *Bacillus subtilis* and (SC4) MN420917 *Bacillus pumilus*. The L-asparaginase enzyme produced was partially purified and their molecular weights were determined by SDS-PAGE. Molecular weights of partially purified L-asparaginase; WC (MN420918 *Bacillus atrophaeus*); 100 kDa, E6 (MN420916 *Bacillus subtilis*); 35 kDa and SC4 (MN420917 *Bacillus pumilus*); 75 kDa.

2019, 68 pages

Keywords: L- asparaginase, *Bacillus*, flora of the digestive system, SDS-PAGE

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kıymetli değerlendirme ve tavsiyelerinden dolayı jüri üyelerim Sayın Doç. Dr. Mehmet Nuri AYDOĞAN ve Sayın Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ hocalarıma teşekkürü borç bilirim. Tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerine başvurduğum Sayın Öğretim Görevlisi Dr. Murat ÖZDAL'a, çalışmalarımın her aşamasında emeği olan değerli arkadaşım Özlem GÜLMEZ'e ve laboratuvar arkadaşım Ebru GEZGİNCİOĞLU'na teşekkür ederim.

Hayattaki en güzel nasiplerimden olan, manevi destekleri ile beni rahatlatan değerli dostlarım Kübra POLAT ve Serap BEKEN'e, aynı evi paylaştığımız dönemde ve sonrasında, birlikte yaşadığımız, hayatımızın en tatlı hatıraları için kardeşlerim Duygu ARSLAN, Mine TOPRAK ve Zeynep MANİSALI'ya teşekkür ederim.

Her konuda beni destekleyen, yoluma ışık tutan, bütün kardeşlerini şefkatiyle kucaklayan, hayattaki en değerli hazinem olan kıymetli abim Dr. Recep ERTUGAY'a teşekkür ederim.

Dualarıyla her daim yanımda olan, anneme ve babama, ERTUGAY ailesinin ve GÖKÇE ailesinin, varlığı ile bana güç veren her bir üyesine, çok teşekkür ederim.

En mutlu ve en zor anlarımda yanımda olan, kendimi yenilemem ve geliştirmem konusunda bana cesaret veren, kıymetli eşim Gökhan GÖKÇE'ye, onu tanıdığım günden bu yana sevgisi, ilgisi ve desteği için çok teşekkür ederim. Tez yazdığım aylar boyunca bana rahat bir gebelik yaşatan, geleceği günü heyecanla beklediğimiz, ailemizin minik üyesine, nezaketi ve anlayışı için teşekkür ederim.

Emine GÖKÇE

Eylül, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. L-asparaginaz	2
1.1.1. L-asparaginaz enziminin moleküler yapısı.....	3
1.1.2. L-asparaginazla ilgili tarihçe	4
1.1.3. L-asparaginaz enziminin çalışma mekanizması	5
1.2. L-asparaginaz Enziminin Kaynakları	6
1.2.1. Bakteriyel L-asparaginaz.....	6
1.2.2. Fungal L-asparaginaz	7
1.2.3. Algal L –asparaginaz	8
1.3. L-asparaginaz Üretimi	8
1.4. L-asparaginazın Uygulama Alanları	9
1.4.1. L-asparaginazın gıda endüstrisinde kullanımı.....	9
1.4.2. L-asparaginaz enziminin amino asit üretiminde (metabolizmasında) kullanımı	10
1.4.3. L-asparaginaz enziminin biyosensör üretiminde kullanımı	10
1.4.4. Kanser tedavisinde L-asparaginaz	10
1.5. L-asparaginaz Enziminin Toksik Etkileri.....	13
1.6. Çeşitli Hayvansal Organizmaların Bağırsak Mikroflorası ve Biyoteknolojik Önemi	13
1.7. Araştırmanın Amacı	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ	15
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	20
3.1. Materyal.....	20

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	20
3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddeler	22
3.1.3. Kullanılan mikroorganizmalar	22
3.2. Yöntemler	22
3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu ve saflaştırılması	22
3.2.2. Besi yerlerinin hazırlanması	24
3.2.3. Araştırmada kullanılan araç ve çözeltilerin hazırlanması	26
3.2.4. L-asparaginaz üreten izolatların seçimi	27
3.2.5. L-asparaginaz aktivitesinin spektrofotometrik yöntemle ölçülmesi	28
3.2.6. Optimizasyon çalışmaları	29
3.2.7. L-asparaginazın saflaştırılması	30
3.2.8. SDS-PAGE analizleri	30
3.2.9. İzolatların tanısında kullanılan klasik yöntemler	31
3.2.9.a. Bakterilerin sitolojik özelliklerinin belirlenmesi	32
3.2.9.b. Biyokimyasal testler	33
3.2.9.c. Moleküler yöntemler	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	35
4.1. İzole Edilen Bakteriler	35
4.2. L-asparaginaz Enzimi Üretme Yeteneğine Sahip Bakterileri Seçmek İçin	
Hazırlanan ‘‘M9 Ortamı’’ ve Elde Edilen Sonuçlar	35
4.3. İzole Edilen Bakterilerin L-asparaginaz Aktiviteleri	42
4.4. L-Asparaginaz Aktivitesi Yüksek Olan İzolatların Tanı ve	
Karakterizasyonu İçin Yapılan Analiz Sonuçları	43
4.5. Optimizasyon Çalışmalarının Sonuçları	44
4.5.1. Karbon kaynağı optimizasyonu	45
4.5.2. Glikoz miktarı optimizasyonu	45
4.5.3. Azot kaynağı optimizasyonu	46
4.5.4. L-asparaginaz üretiminde pH optimizasyonu	47
4.5.5. Zaman optimizasyonu	47
4.6. L – asparaginazın Kısmı Saflaştırılması ve SDS - PAGE Sonuçları	48
4.7. L – asparaginaz Üreten Mikroorganizmaların Moleküler Tanı Sonuçları	49

4.7.1. MN420916 <i>Bacillus subtilis</i> suşu E6 16S ribozomal RNA geni, kısmi sekans	50
4.7.2. MN420917 <i>Bacillus pumilus</i> suşu SC4 16S ribozomal RNA geni, kısmi sekans	51
4.7.3. MN420918 <i>Bacillus atropheus</i> suşu WC 16S ribozomal RNA geni, kısmi sekans	52
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
5.1. İzole Edilen Bakteriler.....	54
5.2. L-asparaginaz Enzimi Üretme Yeteneğine Sahip Bakterileri Seçmek İçin Hazırlanan “M9 Ortamı” ve Elde Edilen Sonuçlar	56
5.3. İzolatların L-asparaginaz Aktivitelerinin Karşılaştırılması	57
5.4. Optimizasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi	58
5.4.1. Farklı karbon kaynaklarının L-asparaginaz üretimi için karşılaştırılması.....	58
5.4.2. Glikoz miktarının L-asparaginaz üretimine etkisi	59
5.4.3. Farklı azot kaynaklarının L-asparaginaz üretimi için karşılaştırılması	59
5.4.4. pH’nın L-asparaginaz üretimine etkisi	60
5.4.5. Zamanın L-asparaginaz üretimine etkisi	60
5.5. SDS- PAGE Analiz Sonuçları	61
5.6. Sonuç ve Öneri	61
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrat Derece
μ	Mikro
C	Karbon
EC	Enzim Komisyonu
g	Gram
g/l	Gram/Litre
IU	Enzim Aktivitesi Birimi
kDa	Kilodalton
l	Litre
Mm	Milimolar
N	Azot
nm	Nano Metre
pH	Hidrojen gücü (Power of hydrogen)
U	Enzim ünitesi

Kısaltmalar

ALL	Akut Lenfotik Lösemi
AML	Akut Miyeloid Lösemi
CTC	Kanser Enstitüsü Ortak Toksisite Kriterleri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
KOH	Potasyum Hidroksit
NA	Nutrient Agar
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimer Zincir Reaksiyonu

PRED	Prednizon
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Devir/dakika
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SFS	Steril Fizyolojik Su
SSF	Katı Hal Fermentasyonu
TCA	Trikloroasetik asit
VCR	Vinkristin



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. L-asparaginaz rekasiyonunun genel mekanizması	3
Şekil 1.2. Kemoterapi için bakteriden saflaştırılmış L-asparaginaz modeli	4
Şekil 1.3. L-asparagin aminoasidinin L-aspartata hidroliz reaksiyonu.....	5
Şekil 1.4. L-asparaginaz enziminin tümör gelişimi üzerine etkisi	6
Şekil 1.5. L-asparaginaz üretim aşamaları	9
Şekil 1.6. L-asparaginazın antineoplastik etkisi	12
Şekil 3.1. Aerobik ve anaerobik şartlarda bakteri izolasyonu	24
Şekil 3.2. Gram boyama teknik aşamaları	33
Şekil 4.1. L-asparaginaz sentez kapasitesine sahip izolatların kalitatif tayini	36
Şekil 4.2. M9 sıvı ortamdaki L-asparaginaz üretim ve renk değişimi	37
Şekil 4.3. L-asparaginaz üreten izolatların sıvı besiyerinde üç günlük fotoğrafları	37
Şekil 4.4. L-asparaginaz aktivitesi en iyi olan üç izolatın mikroskop görüntüleri	44
Şekil 4.5. L-asparaginazın SDS jel görüntüleri	49
Şekil 4.6. L-asparaginaz üreten türlerin evrimsel analizi	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. L-asparaginaz üreten bakteriler	7
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazların isimleri ile üretici firmaları.....	20
Çizelge 4.1. Çeşitli ortamlardan izole edilen bakteri sayıları ve kodları	35
Çizelge 4.2. Seçici katı besiyerlerinde bakterilerin katı besi yerindeki L-asparajinaz etkinliği.....	38
Çizelge 4.3. İzole edilen bakterilerin KOH ve H ₂ O ₂ test sonuçları	40
Çizelge 4.4. L-asparaginaz üretimi en iyi olan izolatların 480 nm'deki enzim aktivite değerleri.....	42
Çizelge 4.5. L-asparaginaz üretme yeteneği en iyi olan bakterilerin kültürel, morfolojik ve mikroskopik bazı özellikleri	43
Çizelge 4.6. Farklı karbon kaynaklarının L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi.....	45
Çizelge 4.7. L-asparaginaz üretiminde Glikoz miktarının etkisi	46
Çizelge 4.8. L-asparaginaz aktivitesinin azot kaynaklarına göre değişimi.....	46
Çizelge 4.9. L-asparaginaz aktivitesinin farklı pH'larda elde edilen ölçüm sonuçları	47
Çizelge 4.10. L-asparaginaz aktivitesinin günlere göre değişimi	48

1. GİRİŞ

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen, protein yapılı moleküllerdir. Hücre içinde veya hücre dışında etkinlik gösterebilirler. Yüzlerce enzim çeşidi vardır ve birçoğu tanımlanmıştır. Yüksek aktivite, seçicilik ve özgüllük enzimlerin en önemli özelliklerindendir. Bu nedenle, mikrobiyoloji, protein mühendisliği, protein kimyası gibi alanlarda enzim endüstrisine yönelik, heyecan verici çalışmalar vardır. Özellikle enzim saflaştırılması, immobilizasyonu, enzimlerin seçiciliğinin artırılması ve besiyerinin ve ürünlerin inhibisyonunun azaltılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur (Mateo *et al.* 2007).

Enzim kullanıldığı çalışma alanları:

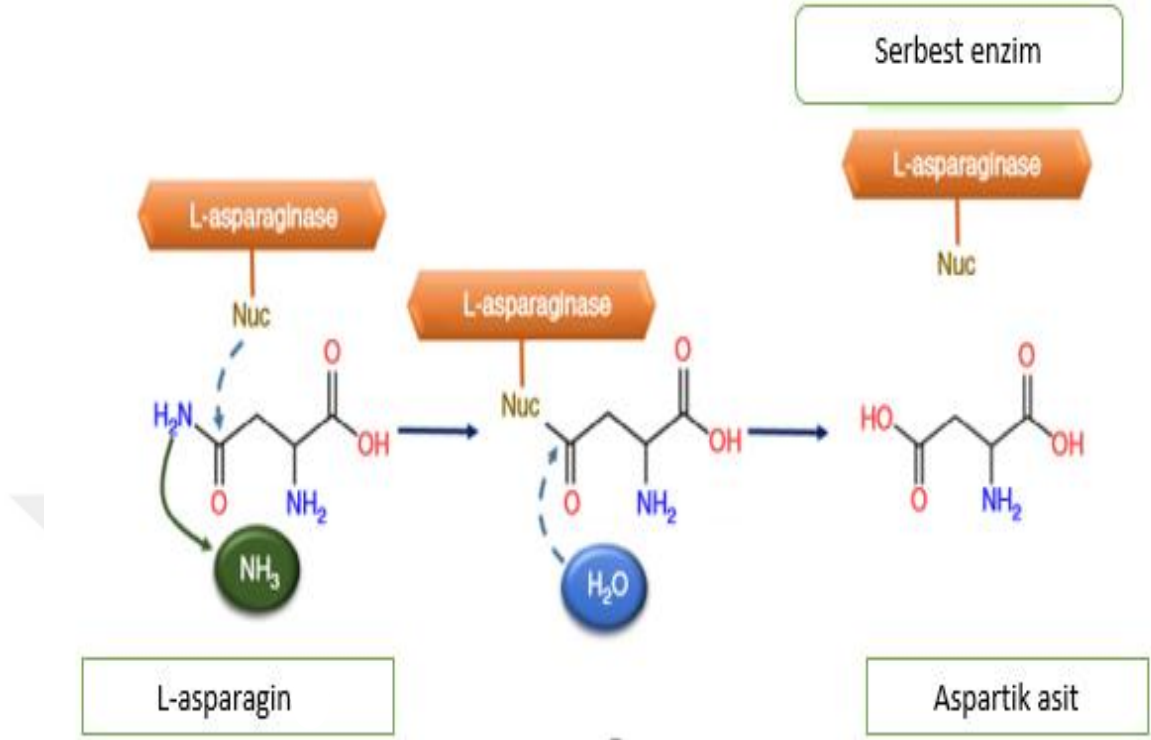
- Mikrobiyal proses teknolojileri (Mikrobiyal fermentasyon süreçleri ve mikrop kökenli enzimlerin kullanıldığı çalışmalar)
- İmmobilize enzim ve mikroorganizma teknolojisi
- Mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi
- Enzim mühendisliği ve teknolojileri (Yem, tekstil, deterjan vb. sanayiye yönelik mikroorganizma kaynaklı enzim üretimi)
- Mikrobiyal proteomik
- Mikroorganizma moleküler gen teknolojileri (Rekombinant DNA teknolojisi, klasik ve yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları ile mikroorganizmalarda mutasyonlar)
- Mikroorganizma kaynaklı biyohidrojen ve biyoenerji üretimini de kapsayan sürdürülebilir biyoüretim teknolojileri
- Metagenomik yöntemlerle yeni enzim genlerinin bulunması ve kültüre alınamayan organizmaların tanısı
- Biyoteknolojik prosesler kullanılarak özellikle çeşitli maddelerin varlıkları ve miktar tayinlerini belirleyen biyosensör bazlı kit malzemelerinin geliştirilmesi

Enzim iyileştirme çalışmalarının yanı sıra, endüstriyel enzim üretimi de enzim çalışmaları arasında önemli bir yere sahiptir. Enzim üretiminde en önemli aşama, spesifik enzim üretme yeteneğine sahip kültür suşlarının seçimidir. Enzim üreten suşlar seçilirken, özel seçici besiyeleri kullanılır ve enzim aktivitesi olup olmadığı bu şekilde tespit edilir (Mateo *et al.* 2007). Enzim üreten suşlarda; biyolojik stabilete ve yüksek ürün verimliliği aranan özelliklerdendir. Ayrıca seçilen suşların patojen olmaması ve ürünlerinin de toksik etkiye sahip olmaması gerekir. Üretilmek istenen enzimin, endüstriyel bir öneme sahip olması da çalışma için önemli bir parametredir. Günümüzde ilaç endüstrisi enzimler için önemli bir pazar alanıdır. Özellikle yüksek spesifikiteye sahip enzimlerin üretimi yoğunluk kazanmıştır. Bazı enzimler birden fazla uygulama alanında etkinlik gösterebilirler.

L-asparaginaz enzimi, hem ilaç sanayisi hem de gıda sanayisinde uygulama alanı bulmuş önemli bir enzimdir. L-asparaginaz hem terapötik hem de endüstriyel aktiviteye sahiptir (Mahajan *et al.* 2014). Özellikle, kanser tedavisinde kullanılan ve sadece kanser hücrelerinin yok olmasına yönelik etki gösteren L-asparaginaz enzimi önemli bir kemoterapi ajanıdır. Bu enzimin üretilmesine yönelik literatürde oldukça fazla sayıda çalışma vardır. L-asparaginaz verimliliği yüksek olan yeni suşların tespit edilmesi, ilaç endüstrisi için ekonomik bir kazanç olacaktır.

1.1. L-asparaginaz

L-asparaginaz, (L-asparagin amidohidrolaz EC 3.5.1.1.) asparagin aminoasidinin aspartat ve amonyağa yıkımını katalizleyen, amidohidrolaz sınıfı bir enzimdir (Şekil 1.1). Bu özelliği ile eksojen asparagine ihtiyaç duyan T hücre kanserlerinin (Lösemi ve Lenfoma) tedavisinde kullanılır. Kemik iliği faaliyetlerini baskılamaması asparaginazı diğer terapötik ilaçlara üstün kılan bir özelliğidir.

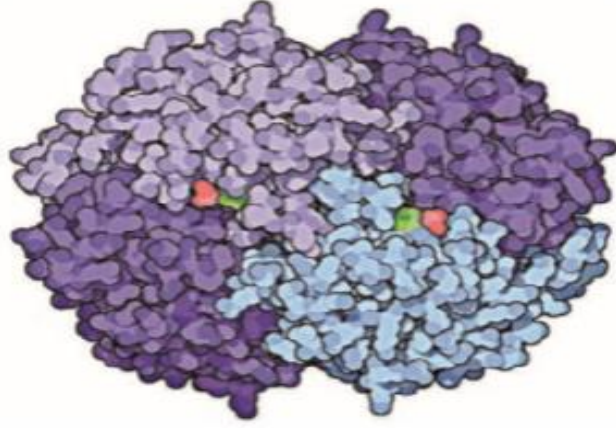


Şekil 1.1. L-asparaginaz reaksiyonunun genel mekanizması (Shrivastava *et al.* 2016)

1.1.1. L-asparaginaz enziminin moleküler yapısı

L-asparaginaz enziminin, moleküler yapısı ile ilgili olarak oldukça detaylı çalışmalar yapılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu farklı kaynaklardan izole edilen L-asparaginaz enziminin daha çok tetramerik olmak üzere, monomerik, dimerik ve hegzamerik formları bulunmuştur.

Bakteriyel L-asparaginazların çoğu, biyokimyasal benzerlik göstermektedir. Bakteriyel L-asparaginaz enzimi, tetramerik yapıdadır. *E.coli* ve *Erwinia sp.* türlerinden izole edilen asparaginazların yapısal özellikleri hakkında bilgiler çoğunluktadır. Gram negatif bakterilerden izole edilen L-asparaginazın üç tipi saptanmıştır (Borek and Jasko'lski, 2001; Krishnapura *et al.* 2016).



Şekil 1.2. Kemoterapi için bakteriden saflaştırılmış L-asparaginaz modeli (Goodsel 2005)

1.1.2. L-asparaginazla ilgili tarihçe

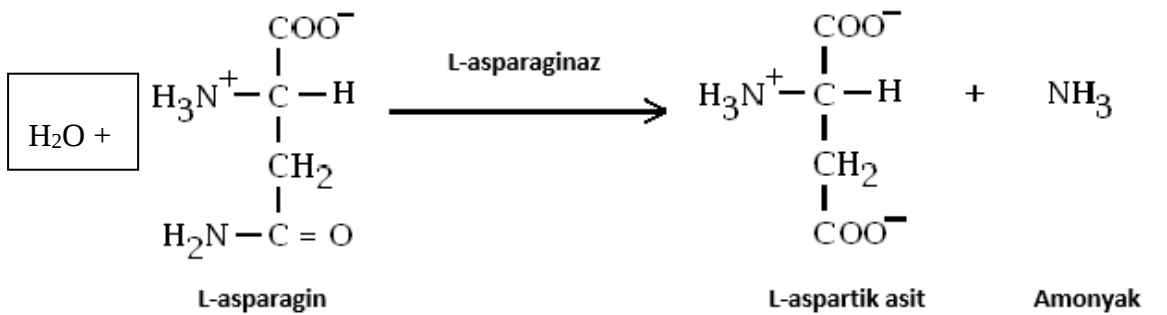
L asparaginaz ilk olarak, 1904 yılında Lang tarafından keşfedildikten sonra, uzun yıllar boyunca çalışılmış ve 1922’de Clementi tarafından L-asparaginazın gelişimi ile ilgili olarak önemli bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışma, Gine Domuzu serumunda L-asparaginazın yüksek aktivitesinin varlığını ortaya koymuş ve diğer memelilerin bu enzimden yoksun olduğu tespit edilmiştir. 1953’te Kidd farelerdeki lenfomayı, transplante Gine Domuzu serumu kullanarak tanılamıştır. Bu sitotoksik aktivitenin at veya tavşan serumunda aktif olmadığı belirtilmiştir. 1961’de fare lösemili hücresi kullanarak benzer sonuçlar elde edilmiştir. (Haley *et al.* 1961). 1961’de Kidd laboratuvarında çalışırken, Clementi tarafından erken korunma ile büyüme inhibisyonu bulgularını karşılaştırarak Gine Domuzu serumlarındaki anti lenfoma aktivitesinin, L-asparaginaz aktivitesine bağlı olduğu sonucuna varmıştır. 1966’da Yellin ve Wriston L-asparaginazın iki izoformunu Gine Domuzu serumundan kısmen saflaştırmayı başarmışlardır. *E.coli*’den L-asparaginaz saflaştırılmıştır (Mashburn and Wriston 1964; Campbell and Mashburn 1969) Saflaştırılan enzimin, antitümör etkisini Gine Domuzu serisine benzer şekilde göstermiştir. Bu bulgular klinik çalışmalar için enzim üretimine temel sağlamış ve Oettgen *et al.* (1967) tarafından ilk olarak 1967 yılında L-asparaginazın lösemili insanlar üzerinde etkili olduğunu gösterilmiştir (Narta *et al.* 2007). ABD Ulusal

Kanser Entitüsü tarafından yapılan araştırmalarda; 15- 39 yaş aralığındaki hastaların tedavisinde L-asparaginazın iyileştirme oranının oldukça düşük olduğu saptanmıştır. 1990-1994 yılları arasında yapılan çalışmalarda çocukların hayatta kalma oranı %80 iken 2000’li yıllarda sağ kalım oranının %88’e yükseldiği görülmüştür (Egler *et al.* 2016).

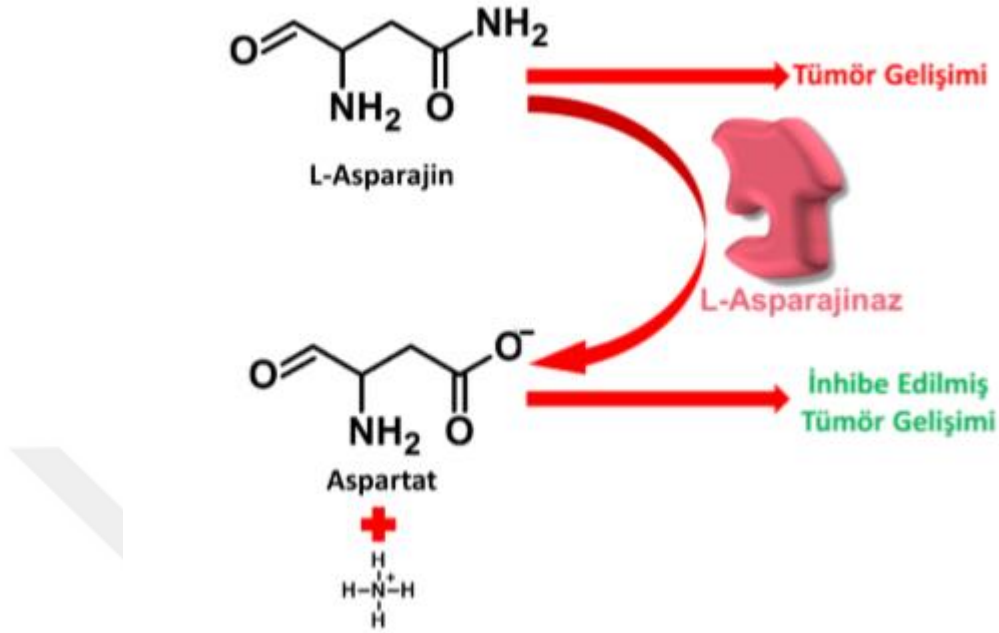
1.1.3. L-asparaginaz enziminin çalışma mekanizması

L-asparaginazın ilk önce, lenfomalarda büyümeyi engellediği gösterilmiştir. 1970’li yıllarda ise antilösemik olduğu ıspatlanmıştır. Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde; vinkristin (VCR) ve prednizon (PRED) ile başlama tedavisinin standart bileşenidir ve önemli ölçüde tedavi başarısını artırmaktadır. L-asparaginaz Antilösemik etkisini, L-asparagini tüketerek ve kanserli hücrelerin apoptozisini artırarak göstermektedir.

Normal hücrelerde asparagin sentetaz bulunur ve bu enzim aspartik asit ve glutaminden L-asparaginaz sentezler. Ancak kanserli hücrelerde bu enzim bulunmaz ve kanserli hücreler L-asparaginaz sentezleyemez. Kanserli hücreler esansiyel olarak L-asparagin aminoasidine ihtiyaç duyarlar. L-asparaginazın kanserli hücreler üzerine etkisi de bu noktada kendini gösterir. L-asparaginaz, L- asparagini aspartik asit ve amonyaka parçalayarak, kanserli hücreleri bu aminoasitten yoksun bırakıp, hücrelerin yok olmasını dolaylı olarak sağlamış olur.



Şekil 1.3. L-asparagin aminoasidinin L-aspartata hidroliz reaksiyonu (Ulu 2014)



Şekil 1.4. L-asparaginaz enziminin tümör gelişimi üzerine etkisi (Orhan 2018)

1.2. L-asparaginaz Enziminin Kaynakları

Mikoorganizmalar, (mantarlar, bakteriler, algler) ile bazı hayvan ve bitki grupları L-asparaginaz kaynağıdır. Büyüme ve üreme koşulları nispeten daha kolay olduğundan, L-asparaginaz üretimi için mikroorganizmaların kullanılması daha yaygındır (Batool *et al.* 2016).

1.2.1. Bakteriyel L-asparaginaz

Farklı ortamlarda (deniz, tatlı su, toprak) büyüyüp çoğalabilen, Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından L-asparaginaz üretilmektedir. Gram pozitif bakteriler, Gram negatif bakterilere göre daha geniş üretim yelpazesine sahiptir. Gram negatif bakterilerin çoğunda iki tip L- asparagin üretilir. Bunlar tip I ve tip II L-asparaginazdır. Tip I L-asparaginaz; L-asparaginaz glutamin ve asparagin amino asitine, Tip II L-asparaginaz ise sadece asparagine spesifiktir ve anaerobik şartlarda uyarılır. *E.coli* ve *Erwinia sp.*

bakteri türlerinden elde edilen Tip II L-asparaginaz, günümüzde ALL tedavisinde kullanılmaktadır. L-asparaginaz üreten bazı bakteri türleri çizelge 1.1.'de verilmiştir (Batoool *et al.* 2016).

Çizelge 1.1. L-asparaginaz üreten bakteriler

Bakteriler	Kaynak
<i>E. coli</i>	Mashburn and Wriston (1967)
<i>Erwinia aroideae</i>	Peterson and Ciegler (1969b)
<i>Erwinia carotovora</i>	Lee, <i>et al.</i> (1986)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Mukherjee <i>et al.</i> (2000)
<i>Thermus thermophilus</i>	Pritsa and Kyriakidis (2001)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 50071	Abdel-fattah and Olama (2002)
<i>Erwinia carotovora</i>	Kamble <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus circulans</i> MTCC 8574	Hymavathi <i>et al.</i> (2009)
<i>Serratia marcescens</i>	Venil <i>et al.</i> (2009)
<i>Bacillus sp.</i> SB08	Moorthy <i>et al.</i> (2010)
<i>Pectobacterium carotovorum</i> MTCC 1428	Kumar <i>et al.</i> (2013)
<i>Serratia marcescens</i>	Ghosh <i>et al.</i> (2013)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Mahajan <i>et al.</i> (2014)
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Narayana <i>et al.</i> (2008)
<i>Marine actinomycetes</i>	Basha, Rekha, Komala, and Ruby (2009)
<i>Streptomyces noursei</i> MTCC 10469	Dharmaraj (2011)
<i>Streptomyces ABR2</i>	Sudhir <i>et al.</i> (2012)

1.2.2. Fungal L-asparaginaz

Bakteriyel L-asparaginazların yanı sıra, funguslar da L-asparaginazın önemli kaynaklarındandır. L-asparaginaz kaynağı olarak, bakterilerin yerine fungusların kullanımı immünolojik reaksiyonları daha da azaltır. Funguslar, ökaryotik organizma olduklarından, insan immün sistemine daha kolay uyum sağlayan L-asparaginaz üretebilirler. (Batoool *et al.* 2016). Bazı fungal L-asparaginaz kaynakları tablo1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. L-asparaginaz üreten funguslar

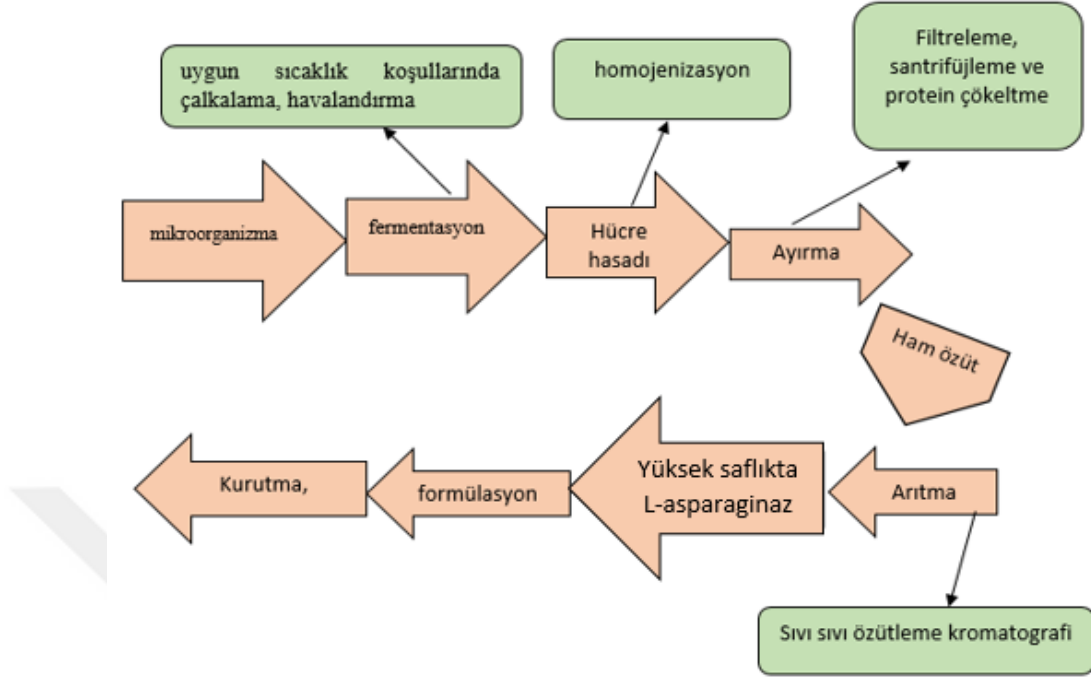
Fungus	Kaynak
<i>Aspergillus terreus</i>	De-Angeli <i>et al.</i> (1970)
<i>Fusarium tricinctum</i>	Scheetz, Whelan, and Wriston (1971)
<i>Aspergillus niger</i>	Mishra (2006)
<i>Aspergillus terreus</i> MTCC 1782	Baskar and Renganathan (2009)
<i>Fusarium equiseti</i>	Hosamani and Kaliwal (2011)
<i>Penicillium sp.</i>	Patro and Gupta (2012)
<i>Penicillium digitatum</i>	Shrivastava <i>et al.</i> (2016)
<i>Cladosporium sp.</i>	Kumar and Manonmani (2013)

1.2.3. Algal L –asparaginaz

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *Chlamydomonas sp.* ve sarı yeşil alg olan *Vaucheria uncinata*‘dan L-asparaginaz elde edilmiştir (Doriya *et al.* 2016).

1.3. L-asparaginaz Üretimi

L-asparaginazın üretimi ve optimizasyonu, çeşitli mikroorganizmalardan katı hal fermentasyonu ve batık fermentasyon yöntemiyle elde edilir. Batık kültür, katı hal fermentasyonuna kıyasla L-asparaginaz üretimi için maliyetli ve düşük verimlidir. L-asparaginaz üretimi Şekil 1.5’te özetlenmiştir.



Şekil 1.5. L-asparaginaz üretim aşamaları

1.4. L-asparaginazın Uygulama Alanları

L-asparaginazın bilinen en geniş uygulama alanı ilaç endüstrisidir. Ancak bunun yanı sıra, gıda endüstrisi, amino asit üretimi ve biyosensör üretiminde de kullanılmaktadır. L-asparaginaz enzimi günümüzde Elspar, Oncaspar Crisantaspase, kidrolase ve Erwinase gibi ticari isimlerle satılmaktadır.

1.4.1. L-asparaginazın gıda endüstrisinde kullanımı

Gıda endüstrisinde, ürünlerin besleyici özelliklerini iyileştirmek veya korumak için gıdalara ısıl işlem uygulanmaktadır. Yapılan işlemler, akrilamid gibi toksik bileşiklerin oluşumuna da neden olmaktadır. L-asparaginaz enzimi kullanılarak, akrilamidin öncü maddelerinden olan L-asparagin aminoasidi parçalanır. Bu yöntemle, gıda maddelerinde bulunan akrilamid miktarı düşürülmüş olur (Akgün ve Arıcı 2018). Kızartma ve pişirme

işleminde önce, L-asparaginaz enziminin kullanılmasının, işlenmiş nihai üründe akrilamid seviyesini %99'dan fazla azaltabileceği doğrulanmıştır (Zyzak *et al.* 2003).

1.4.2. L-asparaginaz enziminin amino asit üretiminde (metabolizmasında) kullanımı

Lizin ve threonin gibi aminoasitlerin öncü maddesi olan aspartik asit L-asparaginazın aktivitesi ile oluşur. Aspartik asit aynı zamanda Krebs döngüsünün de öncül maddelerindendir (Sinha *et al.* 2013).

1.4.3. L-asparaginaz enziminin biyosensör üretiminde kullanımı

L-asparaginaz, kanser veya gıda endüstrisinde asparagin seviyelerini analiz etmek için, biyosensörlerin geliştirilmesinde kullanılır (Batool *et al.* 2016). Ayrıca, L-asparaginazlar, enzimatik reaksiyonları sonucu ürettikleri yüksek miktarda amonyak ve hasta kanında bulunan bu enzimin doğrudan korelasyonundan dolayı, tanı biyosensörü olarak kullanılmaktadırlar (Verma *et al.* 2007).

1.4.4. Kanser tedavisinde L-asparaginaz

Kanser; insanlık tarihi kadar eski olup, özellikle yaşadığımız yüzyılda adından sıkça söz ettiren bir hastalıktır. Genel olarak kanser riski yaşla birlikte artmaktadır.

Hücre siklusunun düzenlenmesindeki onarılamayan hatalar hücre döngüsünün kontrolünün bozulmasına neden olur. Hücre döngüsündeki bu bozulma sonucu hücrelerde kontrolsüz çoğalmalar ve yayılmalar meydana gelebilir. Hücre siklusunun inhibisyonu ise tümör baskılayıcı genlerle sağlanır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar anormal hücre büyümesine neden olur ve bunun sonucunda kanserleşmeler meydana gelir. Kanser oluşumunda, sigara ve alkol kullanımı, yetersiz ve dengesiz beslenme, üreme sağlığı, enfeksiyonlar ve mesleki kanserojenlere maruziyet gibi etmenler etkili olmaktadır. Yetişkinlerde tümör görülme oranı, çocuklarda görülme oranından daha yüksektir.

Yetişkinlerde görülen kanserlerde meme, kolorektal, serviks, akciğer ve prostat kanserleri başı çekerken çocukluk çağı kanserlerinin %25-30'unu lösemiler oluşturur. Çocukluk çağında Akut Lenfoblastik Lösemilerin (ALL) görülme sıklığı Akut Miyelomonositik Lösemiye (AML) göre daha fazladır. Lösemilerin %97'sini ALL oluşturmaktadır (Shrivastava *et al.* 2016)

ALL'de günümüzde tedavi protokolleri ile hastalarda yaklaşık olarak %80-90 tedaviye yanıt ve sağ kalma oranına ulaşılmıştır. Kanser tedavisinde kullanılan ajanlar hücre döngüsünde meydana gelen DNA hasarlı hücrelerin yok edilmesine yöneliktir. Bu çalışmanın konusunu oluşturan L-asparaginaz enzimi, normal hücrelerin ihtiyaç duymadığı ancak kanserli hücrelerin ihtiyaç duyduğu; kanda bulunan ve esansiyel olmayan, L-asparagin aminoasidinin aspartat ve amonyağa yıkımını katalizleyerek, kanserli hücrelerin büyümesini yavaşlatıp ölmesine yol açar. L-asparaginaz; ALL (Akut Lenfoblastik Lösemi), miyelomonositik lösemi, kronik lenfatik lösemi gibi birçok kanser türünde kullanılan tedavi ilaçları ile kombine edilen ve en iyi bilinen terapötik ajanlardan birisidir (Kidd 1953; Broome 1961).

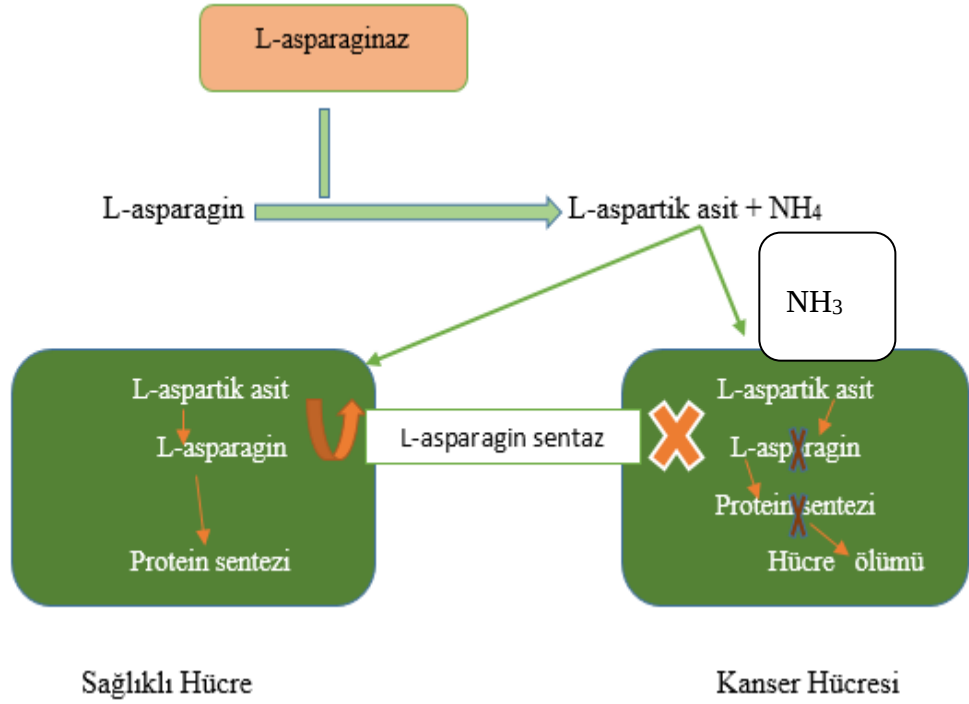
Kanser tedavisinde kullanılan en iyi ilaçlar, kanser hücrelerine özgü özelliklere saldıran ilaçlardır. Kanser tedavisinde böyle bir etkiye sahip ilaçlar çok nadir olarak bulunmaktadır, ancak L-asparaginaz ile bu amaca yaklaşılmaktadır.

Normal hücreler asparagin sentetaz enzimini kullanır. Enzim aspartat alır ve bir amin ekler, asparagin karakteristik amid grubunu oluşturur. Ancak kanserli hücreler bu enzimden yoksundur ve asparagin oluşturamazlar.

L-asparaginaz enziminin en yaygın bilinen uygulama alanı, insanlarda anti lösemik aktivitesi nedeniyle terapötik bir ajan olarak kullanılmasıdır. Gine domuzunda yapılan çalışmalar sonucunda, bu enzimin anti-lenfoma aktivitesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Narta *et al.* 2006). Kan plazmasında bulunan L-asparagin aminoasidini parçalayabilen bu enzim 1922'den beri, malign tümörlere karşı terapötik bir ajan olarak

kabul edilmiştir (Ulu 2014). Kanseri hücreleri, azalmış L-asparagin ekspresyonunda normal hücrelerden farklılaşırlar. Bu hücreler kan plazmasında bulunan -esansiyel olmayan- L-asparagine ihtiyaç duyarlar.

L-asparaginaz enzimi, L-asparagin aminoasidini amonyak ve L-aspartik aside parçalayarak, serum ve beyin omurilik sıvısında bulunan asparaginleri tüketir. L-asparagin yokluğunda, kanserli hücreler protein sentezi ve DNA sentezi gibi önemli yaşamsal faaliyetlerini yerine getiremezler. Bu enzim, kanserli hücreleri L-asparagin aminoasidinden yoksun bırakmak suretiyle kanserleşmeye karşı önemli ölçüde iyileştirme sağlar.



Şekil 1.6. L-asparaginazın antineoplastik etkisi (Van den Berg 2011)

1.5. L-asparaginaz Enziminin Toksik Etkileri

L-asparaginaz enzimi, belirgin bir toksisite profiline sahiptir. Akut aşırı duyarlılık, pankreatit, hepatoselüler disfonkiyon ve hiperglisemi gibi etkileri vardır (Oettgen *et al.* 1970). Asparaginaz toksisitesi 2 ana kategori altında incelenmektedir.

- Yabancı bir proteine aşırı duyarlılık
- Protein sentezini baskılayıcı etki

Ticari olarak elde edilen L-asparaginaz preparatlarındaki toksik etki sıklığı birbirine yakındır. Ancak L-asparaginazın modifiye edilmiş hali olan pegaspargaz şeklinde kullanımının, alerjik reaksiyonlarda azalma sağladığı bilinmektedir (Narta *et al.* 2007). Ayrıca, diğer kemoterapi ajanlarının aksine; ağız kuruluğu, kusma, saç dökülmesi gibi yan etkilere sebep olmazken; kemik iliği üzerine olumsuz etki göstermez. Kanseri Enstitüsü Ortak Toksisite Kriterleri (CTC) tarafından önerilen toksisite derecesi aşırı duyarlılıktır. Aşırı duyarlılık belirtileri; sıkça idrara çıkmak, deri döküntüleri, ödem, üşüme, ateş ve nadir görülen şok halidir.

1.6. Çeşitli Hayvansal Organizmaların Bağırsak Mikroflorası ve Biyoteknolojik Önemi

Hayvanlar, gastrointestinal kanallarında; bakteri, maya, virüs ve protozoalardan oluşan kompleks bir mikrobiyal topluluk barındırırlar. Bu mikroplar, konakçının biyolojik süreçlerinde (büyüme, gelişme, sindirim, beslenme, hastalığa direnç vb.) önemli ölçüde etkilidirler. Bu nedenle mikrobiyota çalışmalarının önemli bir amacı, ev sahibinin sağlığını geliştirmektir (Romero *et al.* 2014). Mikrobiyota çalışmalarının bir diğer amacı ise; bu zengin mikrop kaynaklarını kullanarak biyoteknolojik süreçlere katkı sağlamaktır. Özellikle organizmaların sindirim sistemleri, mikrobiyal kaynak olarak oldukça verimlidir. Hayvanlarla simbiyotik ilişkide olan mikropların kullanıldığı bazı biyoteknolojik çalışmalar;

- Haşere kontrolü,
- Patojen kontrolü,
- Antibiyotik üretimi,
- Endüstriyel açıdan önemi olan enzimlerin üretimi,
- Biyoremediyasyon (Berasategui *et al.* 2016).

L-asparaginaz enzimi insanlar tarafından üretilemezken çeşitli hayvan ve bitki gruplarında bulunmaktadır. Ancak bitki ve hayvan gruplarından bu enzimin ekstraksiyonu oldukça güçtür. L-asparaginazın asıl kaynağı çok geniş yelpazede dağılım gösteren mikroorganizma (bakteriler, mantarlar) gruplarıdır.

Son yıllarda araştırmalar, etkili ve yüksek verimde L-asparaginaz üreten mikroorganizmaların izolasyonu ve tanısı üzerinde yoğunluk kazanmış ve mikroorganizma kaynağı olarak daha önce iyi araştırılmamış habitatlar tercih edilmiştir.

1.7. Araştırmanın Amacı

Bölüm 1.1.7’de de belirtildiği üzere, hayvansal organizmaların sindirim sistemi, çeşitli biyoteknolojik üretimler (ilaç etken maddesi, antioksidan, antiviral, antimikrobiyal maddeler, her türlü biyodegradasyon ve biyoremediyasyon proseslerinde kullanılabilecek mikrop ve enzimler) için gerekli mikroorganizma kaynağı olarak çok elverişlidir. Bu araştırmada çeşitli hayvan gruplarının (insan, sığır, tavuk, balık, böcek ve solucan) sindirim sistemlerinden etkili ve yüksek verimde L-asparaginaz üreten mikroorganizmaların izolasyonu ve tanısı amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

L-asparaginaz enziminin klinik uygulamaları ile ilgili literatürde çok sayıda makale mevcuttur. Çalışmamızın konusu L-asparaginazın mikrobiyal üretimi ile ilgili olduğundan, kaynak özetleri kısmında mikrobiyal üretim ile ilgili çalışmalara yer verilmiştir.

Abdel-Fattah and Olama (2002), *Pseudomonas aeruginosa*'dan üretilen, L-asparaginaz enziminin katı hal fermentasyonunun, istatistiksel deney tasarımları ile optimizasyon çalışmalarını yapmışlardır. On beş kültür koşullu Plackett-Burman Factoring tasarımı kullanmışlardır. Kazein, pH, hidrolizat ve mısır dik likörünün, enzim üretim sürecini geliştiren en önemli faktörler olduğunu belirlemişlerdir. İkinci optimizasyon adımı olarak Box-Behnken tasarımı kullanmışlardır. Maksimum L-asparaginaz aktivitesi (142.8 IU) için; kazein hidrolizat %3.11, pH 7.9, mısır dik likörü %3.68, optimum değerlerdir ve beşten fazla bazal ortamda aktiviteyi katladığı gözlenmiştir.

Mishra (2006), üç baklagil mahsülünün (*Cajanus cajan*, *Phaseolus mungo* ve *Glycine max*) tarımsal atıklarını kullanarak, katı hal fermentasyonunda (SSF), *Aspergillus niger*'den yüksek seviyede L-asparaginaz üretmiştir. SSF'de tarımsal atıklar tek besin kaynağı olarak kullanıldığında en yüksek enzim verimliliğini *G. max* ardından *P. mungo* ve *C. cajan* göstermiştir. Enzim verimi pH 6.5, sıcaklık $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de (40.9 U/g kuru substrat) maksimum olarak ölçülmüştür.

Narayana *et al.* (2008), *Streptomyces albidoflavus* ile L-asparaginaz üretiminde optimizasyon çalışmaları yapmışlardır. Karbon kaynağı olarak maltoz ile desteklenmiş kültür ortamında, L-asparaginaz miktarının daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. pH 7.5 ve sıcaklık 35°C enzim üretimi için optimum koşul olarak belirlenmiştir. *S. albidoflavus* hücrelerinden, daha fazla L-asparaginaz salımı için; soy, EDTA ve lizozim gibi hücre bozucu ajanlarla muamele etmişlerdir. *S. albidoflavus* tarafından üretilen

enzim; amonyum sülfat, Sephadex G-100 ve CM-Sephadex C-50 jel filtrasyonu ile saflaştırmış ve moleküler ağırlığı 112 kDa olarak ölçülmüştür.

Kukurova *et al.* (2009) L-asparaginazın kızartılmış hamur pasta modelindeki akrilamid üzerine etkisini araştırmışlardır. 180-200°C'de kızartılan hamur pasta örneklerine 100-500 U/kg L-asparaginaz ilave edilmesi sonucunda akrilamid seviyesinin %96-97 oranında azaldığını dahası asparaginazın glutamin ve glutamik asit oluşumunu da etkilediğini ortaya koymuşlardır.

Khamna *et al.* (2009) yaptıkları araştırmada; Tayland'daki 16 şifalı bitkinin kök bölgesinde bulunan topraktan, aktinomiset izole etmişlerdir. Suşlar L-asparaginaz aktivitesi açısından değerlendirmişlerdir. 30 suşun enzim aktivitesi gösterdiğini bulmuşlardır. Enzim üretim aralığı 0.03-1.50 IU arasında değerler göstermiştir. *Cymbopogon citratus* (Limon otu) rizosfer toprağından izole edilen CMU-H002, en yüksek enzim aktivitesini göstermiştir.

Maysa *et al.* (2010) yılında yaptıkları bir araştırmada L-asparaginazın antitümör aktivitesini ve farklı taşıyıcıya immobilize ederek enzim aktivitesini ölçmüşlerdir. *Bacillus sp.* R36 kaynağından saflaştırılan L-asparaginaz enzimi, glutaraldehit ile önceden aktive edilmiş sekiz farklı taşıyıcıya (aktif karbon, selit, kitin, karboksimetil selüloz, yumurta kabuğı, silikajel, trikalsiyum fosfat ve kitosan) immobilize etmişlerdir. Her bir taşıyıcı için 50U/g enzim kullanmışlardır. Araştırma bulgularında en düşük aktiviteyi kitosan (%17.8), en yüksek aktiviteyi ise aktif karbona immobilize edilmiş enzimin gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca *in vitro* olarak iki tümörlü hücrede enzimin antitümör etkisine bakmışlar ve sonuçta, kanserli hücrelerin büyük oranda inhibisyona uğradığını belirtmişlerdir.

Hosamani and Kaliwal (2011), katı hal fermentasyonunda (SSF) soya fasülyesi unu kullanarak, *Fusarium equiseti*'nin L-asparaginaz üretimini optimize etmişlerdir. İnkübasyon süresi 48 saat, başlangıçtaki nem ihtivası %70h/h, partikül boyutu 3mm, aş

hacmi %20 v/v, glikoz ağırlıkça %0.5, amonyum sülfat ağırlıkça %0.5 ve ekstrakt ağırlıkça %0.5, optimum şartlarında maksimum L-asparaginaz verimine (8.5 IU) ulaşmışlardır.

Nazemi and Miri Nargesi (2013), bu çalışmada ekstraselüler olarak L-asparaginaz enzimi üreten *Bacillus sp.* türlerini araştırılmıştır. Proteince zengin toprak örneklerinden *Bacillus sp.* izole edilmiştir. Çalışmalarında kültür ortamı olarak M9 besi yerini kullanmışlardır ve yüksek aktiviteye sahip enzim ürettiklerini belirtmişlerdir.

Ebrahiminezhad *et al.* (2014) tarafından, İran'ın güneyinden 40 mikroalgal izolatu toplanmış, hücre içi ve hücre dışı L-asparaginaz aktiviteleri incelenmiştir. 18S ve rDNA sekanslaması ile moleküler tanımlama için en yüksek aktivite gösteren suşlar izole etmişlerdir. Dizi benzerliği analizini, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nden (NCBI) BLAST programını kullanarak yapmışlardır. *Chlorolle vulgaris*'in 18S rDNA dizileri diğer raporlarla %100 benzelik gösterdiği belirtilmiştir. *C. vulgaris*'in L-asparagin varlığında bir indüklenebilir hücre içi L-asparaginaz üretebileceğini ve L-asparaginin mikroalgin büyümesini indükleyebildiğini bulmuşlardır.

Ulu (2014), L-asparaginazın immobilizasyonu ve daha etkin kullanımı için biyoyumlu polimerik yapılar ortaya koymuştur. Katı matriks olarak polimetilmetakrilat (PMMA), polihidroksietilmetakrilat (PHEMA) ve polimetakrilikasit polimetilmetakrilat P(MA-MMA) ve bu polimerlerden yola çıkarak farklı oranlarda nişasta katkılı polimerik yapılar hazırlanıp, tüm yapılar FTIR, TGA, DTA, DSC ve sıvı temas açısı ile yapısal olarak karakterize edilmiştir. Polimerik yapılara nişasta katkılamanın polimerik yapıların biyobozunurluğunu arttırdığı, sıvı temas açısını düşürdüğü ve bozunma sıcaklığı aralığını genişlettiği tespit edilmiştir.

Batool *et al.* (2016) yaptıkları çalışmada, L-asparaginazı bitkisel ve karasal mikroorganizmalar dahil olmak üzere çok çeşitli organizmalardan izole etmişlerdir. *Escherichia coli* ve *Erwinia sp.* tarafından üretilen L-asparaginazın üç boyutlu yapısını göstermişlerdir. Aynı zamanda katı hal (SSF) ve batık (SmF) fermentasyonunu,

saflaştırmayı, karakterizasyonu ve biyolojik rollerini kullanarak üretim yöntemlerini listelemişlerdir. Bu makalede, enzimle ilgili hem geçmiş hem mevcut uygulamalar incelenmiş ve gelecekteki beklentiler tartışılmıştır.

Doriya *et al.* (2016) yayınladıkları makalede, L-asparaginaz enziminin bitki ve hayvanlardan elde etmenin zorluğunu belirtmişlerdir. Üretim için bakteriler ve mantarlar gibi çeşitli mikroorganizma gruplarının kullanılması daha yaygındır. Bakterilerden elde edilen L-asparaginaz hassas reaksiyonlara neden olur. Bunun üstesinden gelmek için mantarlar gibi ökaryotik organizmalar L-asparaginaz üretimi için kullanılabilir. L-asparaginazın üretimi için mevcut olan çeşitli yöntemleri özellikleSSF ve SmF işlemlerinin avantajlarını ve sınırlamalarını detaylı olarak çalışmışlardır. Tarımsal endüstriye ait atıkların SSF'sini kullanarak asparaginaz üretiminde daha verimli sonuçlar elde edileceği kanaatine varmışlardır.

Cachumba *et al.* (2016), yaptıkları çalışmada; L-asparaginaz uygulamalarını, farklı mikroorganizmalardan üretimini, mevcut araştırmaları ve sanayi için daha karlı üretimi ve bu üretimin avantajlarını-dezavantajlarını araştırmışlardır. Yapılan çalışmaya göre, endüstriyel üretim *Escherichia coli* ve *Erwinia chrysanthemi* gibi bakteriler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Prokaryot enzimlerinin genellikle aşırı duyarlılık ve immün inaktivasyon gibi etkileri olduğunu ve filamentöz mantarlar ve mayalar gibi ökaryotik mikroorganizmaların, insan sistemi ile daha uyumlu enzim üretebildiklerini belirtmişlerdir.

Erva *et al.* (2017), *Enterobacter aerogenes* KCTC2190/MTCC111 enzim üretimini etkileyen kültür koşulları ve beslenme oranları, sıvı kültür ortamında optimize edilmişlerdir. pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, karbon ve azot kaynakları, indükleyici konsantrasyonu ve inokulum büyüklüğü gibi proses parametrelerini dikkate almışlardır. Bu çalışmada, elde edilen en iyi enzim aktivitesi, başlangıç değerine kıyasla 2,6 kat bir artış olan 7,6 U/ml olarak ölçülmüştür. Ayrıca L-asparaginaz üretimi, cevap yüzeyi metodolojisi kullanılarak optimize edilmiş ve proses değişkenlerinde deneysel sonuçlar

kaydedilmiştir. Geleneksel optimizasyon yaklaşımından 2.4 kat daha yüksek olan 18,35 U/ml L-asparaginaz aktivitesi verdiğini gözlemlemişlerdir.



3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan cihazlar kullanılmıştır. Kullanılan aletler, üretici firmalar ve aletlerin kullanım amaçları Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazların isimleri ile üretici firmaları

Cihaz	Firma	Kullanım Amacı
pH metre	Orion 3 star pH portable thermo scientific	Besiyerlerinin ve tampon çözeltilerin pH’sının ayarlanmasında kullanılmıştır.
Isıticılı manyetik karıştırıcı	Chiltern HS31, UK	Besiyeri hazırlanmasında homojenizasyonu sağlamak amacıyla kullanılmıştır.
Otoklav	HMC Hirayama Hiclava HV-110, Japonya	Malzemelerin, sıvı ve katı besiyerlerinin ve çözeltilerin sterilizasyon işlemlerinde kullanılmıştır.
Etüv	Philip-Harris, İngiltere	Kültürlerin inkübasyonunda kullanılmıştır.
Çalkalamalı inkübatör	Zhicheng ZHWY-200B, Çin	Optimizasyon çalışmalarında sıvı besiyerinde, biyomas üretiminde kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. (Devam)

Spektrofotometre	Schimadzu UV mini-1240	Enzim aktivitesinin tayini için kullanılmıştır.
Santrifüj cihazı	Universal hettich 320R	Enzim miktarlarının ölçülmeden önce besi yerlerinden alınan örnekler santrifüj edilmiştir
Saf su cihazı,	Nüve NS 112	Çalışma esnasında besiyeri hazırlama ve tampon çözelti hazırlamada kullanılmıştır.
Buzdolabı	Arçelik nofrost	Stok kültürlerin saklanmasında kullanılmıştır.
İnkübatör	Memmert E410	Kültürlerin belli sıcaklıkta gelişime bırakılması için kullanılmıştır.
Hassas terazi	Denver Instruments	Besiyeri hazırlamada, kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.
Vorteks	Heidolph Reax Top	Enzim miktar tayini yapmadan önce Nessler çözeltisiyle izolatların karıştırılmasında kullanılmıştır.
Anaerobik Jar	Oxoid	Anaerobik şartlarda mikroorganizma üretimi için kullanılmıştır.
Mikroskop	Boeco BM 180	Mikroorganizmaların şekil ve Gram özelliklerini belirlemek için kullanılmıştır.
Elektroforez	Owl Separation Systems P10DS	Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığının belirlenmesinde

3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddeler

Mikroorganizmaların izolasyonu, geliştirilmesi ve L-asparaginaz enzimi üreten izolatların seçimi, stoklanması ve L-asparaginaz üretiminin optimizasyon çalışmaları için kullanılan kimyasal maddeler; analitik saflıkta olup Merck, Oxoid, Fluka Riedel, Sigma ve Difco firmalarından temin edilmiştir. Seçici besiyeri olan, M9 ortamında kullanılan L-asparagin aminoasidi ise Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarından temin edilmiştir.

Mikroorganizmaların izolasyonu ve geliştirilmesi için Nutrient Agar ve Tryptik Soy Agar kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan mikroorganizmalar

Bu çalışmada çeşitli hayvansal organizmaların sindirim sisteminden ve topraktan izole edilen mikroorganizmalar kullanılmıştır. İzole edilen mikroorganizmalar içerisinde insan dışkılarından WC, sığır sindirim sisteminden E6 ve toprak solucanından izole edilen SC4 kodlu bakteriler için sitolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak tür tanısı yapılmıştır. İnsan dışkılarından izole edilen WC; *Bacillus atrophaeus*, sığır sindirim sisteminden izole edilen E6; *Bacillus subtilis* ve toprak solucanı sindirim sisteminden izole edilen SC4; *Bacillus pumilus*'tur.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu ve saflaştırılması

Erzurum Serçeme deresinden alınan toprak örnekleri, umumi kullanımda olan tuvalet taşından örnekler ile solucan, böcek, kurbağa, balık, tavuk ve sığır sindirim sistemlerinden örnekler alınmıştır. Alınan örnekler; %0.9 NaCl içeren steril fizyolojik suda (SFS) 10^{-9} 'a kadar seri dilüsyonlara tabi tutulmuştur. Daha sonra dilüe edilmiş

örneklerden 0.1 ml alınarak Nutrient Agar ortamına yayma ekimleri yapılmıştır. Her bir örnek 30°C’de 24-48 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda gelişen koloniler, morfolojik farklılıkları göz önünde bulundurularak, dört fazda çizgi ekim şeklinde ayrı ayrı petrilere transfer edilmiştir.

Farklı organizmaların bünyesinde bulunan bakterilerin izolasyonu için; sığır, tavuk, kurbağa, balık, böcek gibi hayvanların sindirim sistemlerinden örnekler alınmıştır. Ayrıca, umumi tuvaletten ve kanalizasyon geçen ırmak kenarından toprak örnekleri alınarak bakteri izolasyonu yapılmıştır.

- **İnsan dışkısı;** okul tuvalet taşından alınan örnek laboratuvara getirilerek izolasyon yapılmıştır.
- **Toprak örneği;** Serçeme deresinin hemen kıyısından, bir miktar toprak alınarak içeriğindeki bakteriler izole edilmiştir.
- **Sığır bağırsağı;** Erzurum Et ve Balık Kurumu’nun kesim hanesinde, temiz koşullarda kesilen *Bosprimigenius taurus* (sığır) bağırsak parçası alınarak laboratuvara getirilmiştir.
- **Tavuk diseksiyonu;** Pasinler’den temin edilen *Gallus gallus domesticus* (tavuk) laboratuvarımıza kafası kesilmiş ve tüylerinden arındırılmış olarak getirilmiştir. Laboratuvarımızda steril şartlarda; bir bisturi ile kesilmiş, bağırsağından ve kursağından alınan örnekler, izotonik sıvıda muhafaza edilmiştir. Daha sonra dilüe edilerek bakteriler izole edilmiştir.
- **Kurbağa diseksiyonu;** bataklık kurbağasının laboratuvarımızda diseksiyonu yapılarak, bağırsağından alınan örnekler izole edilmiştir.
- **Balık diseksiyonu;** serçeme deresinden *Salmo trutta* (alabalık) ve Tortum çayından getirilen *Cyprinus carpio* (sazan balığı) steril koşullarda diseksiyon yapılarak bağırsaklarından alınan örnekler dilüe edilmiş bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
- **Böcek diseksiyonu;** Erzurum Yoncalık Köyü’nden toplanan *Blaps mortisaga* (Karafatma), ve *Musca domestica* (Kara sinek) türü böcekler %70 derecelik etil alkolde 2 dakika süreyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş ve bağırsak sistemleri disekte

edilerek steril havanla ezildikten sonra platin öze ile bir luk dolusu alınmış ve besiyerine inoküle edilmiştir.

- **Toprak Solucanı;** Erzurum Atatürk Üniversitesi Kampüsü'nden toplanan *Lumbricus terrestris* (toprak solucanı) %70 derecelik etil alkolde 2 dakika süreyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş ve steril havanla ezildikten sonra besiyerine inoküle edilmiştir.

Çalışmada kullanılan balık, böcek ve solucan örneklerinin Atatürk Üniversitesi Biyoloji bölümünde tür teşhisleri yaptırılmıştır. Farklı hayvanların sindirim sisteminden alınan örnekler; hem aerobik hem de anaerobik şartlarda inkübe edilmiştir. Anaerobik için anaerobik jarlar kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler izole edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Aerobik ve anaerobik şartlarda bakteri izolasyonu

3.2.2. Besi yerlerinin hazırlanması

Nutrient Agar (NA) ve Tryptik Soy Agar (TSA): Laboratuvarımızda hazır olarak bulunan SİGMA, MERCK markaları NA veya TSA kullanılarak hazırlanmıştır.

Yatık Agar: Tanımlama, kültür koleksiyonu gibi amaçlarla kullanılan agarlı besiyeridir. Yatık olmasındaki amaç, tüpte geniş bir yüzey elde etmektir. Deney tüplerine, 7 ml tam olarak eritilmiş agarlı besiyerleri dağıtılmış ve otoklavlanmıştır (1.5 atm 121°C’de 15 dakika). Otoklav sonrasında, tüpler henüz sıvı iken bir pipet üzerine, kapakları üst tarafta olacak şekilde yatırılmış ve katılaşması için beklenmiştir. Tüpte, dip kısımların yaklaşık 2.5 cm derinliğinde olmasına dikkat edilmiştir.

Besi Yerlerinden izole edilen mikroorganizmalar, yatık agarlara ekilerek, daha sonra seçici besiyerlerinde denenmek üzere +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

M9 Besi Ortamı: L-asparaginaz üreten bakteri türünü ayırt etmek için M9 ortamı kullanılmıştır. Kontrol petrilerinde, L-asparaginaz içermeyen modifiye edilmiş M9 ortamı (azot kaynağı olarak NaNO_3) kullanılmıştır. M9 ortamının muhtevası aşağıdaki gibidir.

1 litre için;

- 2 gr Glukoz
- 3 gr KH_2PO_4
- 2 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 5 gr L-asparagin
- 0,5 gr NaCl
- 6 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0.014 gr $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- %0.009 gr fenol red
- Saf su ile 1 litreye tamamlanır.

Katı besi yeri hazırlamak için 15 gr agar agar eklenmiştir. Hazırlanan çözelti 121°C’, 1.5 atm’de 15 dakika steril edilmiştir.

3.2.3. Araştırmada kullanılan ayraç ve çözeltilerin hazırlanması

Lügol çözeltisi; 0,5 g potasyum iyodür (KI) ile 1 g iyot 100 ml saf suda çözündürülerek hazırlanmıştır.

Safranin çözeltisi; 0,25 g safranin 100 ml distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

Kristal viyole çözeltisi; 0.5 g kristal viyole 100 ml saf su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

KH₂PO₄ tamponu; 1.7 gram tartılıp 100 ml saf su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır pH 7.2'e ayarlanmıştır.

Tris- HCl tamponu; 1,51 gr Tris 200 ml saf su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Ph 7'ye ayarlanarak hacim 250 ml'ye tamamlanmıştır.

TCA - trikloroasetik asit; (Lipid peroksidasyon için homojenizasyon çözeltisi) : 100 ml saf su içerisine 0,1 g TCA ilave edilerek hazırlanmıştır.

Ayırma jeli tamponu; (1,5 M Tris, pH: 8,8) : 18,15 g tris 50 ml saf suda çözülür. HCl ile pH 8,8'e ayarladıktan sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Yükleme jeli tamponu; (0,5 M Tris, pH: 6,8) : 3 g tris 40 ml saf suda çözülür. HCl ile pH 6,8'e ayarlandıktan sonra saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

SDS: 1g SDS son hacim 10 ml olacak şekilde saf suda çözündürülerek hazırlanmıştır.

Yığma jeli tamponu; 1 M'lık Tris-HCl (pH: 6,8)'den 380 µl, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 400 µl, %10'luk SDS'den 30 µl, %5'lik TEMED'den 3 µl, ve saf sudan 2,2 ml alınarak karıştırılarak hazırlanmıştır. Son olarak yine günlük hazırlanmış %10'luk amonyum persülfat $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (PER)'den 30 µl ilave edilmiştir.

Amonyum persülfat (polimerizasyon başlatıcı); 0,05 g amonyum persülfat son hacim 500 µl olacak şekilde saf suda çözündürülerek hazırlanmıştır.

Örnek uygulama tamponu; 0,125 M Tris, %4, SDS %20, gliserol %10, 2-merkaptotanol %0.2 bromfenol mavisi pH: 6,8 2,5 ml yükleme jeli tamponu, 4 ml %10 SDS, 2 ml gliserol, 1 ml 2-merkaptotanol alınıp son hacim 10 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanmış ve pH 6.8'e ayarlanmıştır. Karışıma 0,02 g bromfenol mavisi katılarak karıştırılmıştır.

Tank tamponu; (0,025 M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH: 6,8) : 3g Tris, 14,4 g Glisin, 1 g SDS alınmış ve 900 ml saf suda çözündürülerek pH 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 1000 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır.

SDS-PAGE Boyama çözeltisi; 500 ml metanolde, 1 g coomassie brilliant blue R-250 çözündürülmüş ve daha sonra 100 ml asetik asit saf su ile 1 litreye tamamlanarak çözündürülerek hazırlanmıştır.

SDS-PAGE Yıkama çözeltisi; 125 ml metanol, 175 ml asetik asit ve 2200 ml saf su kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.4. L-asparaginaz üreten izolatların seçimi

L-asparaginaz sentezleme kapasitesine sahip bakterileri tespit etmek için; öncelikle elde edilen izolatlardan, agar agar ile katılaştırılmış ortamlara ayrı ayrı çizgi ekim yapılmış ve

30°C’de inkübe edilmiştir. 24, 48 ve 72. saatler sonunda renk değişimleri incelenmiş ve fotoğrafları alınmıştır.

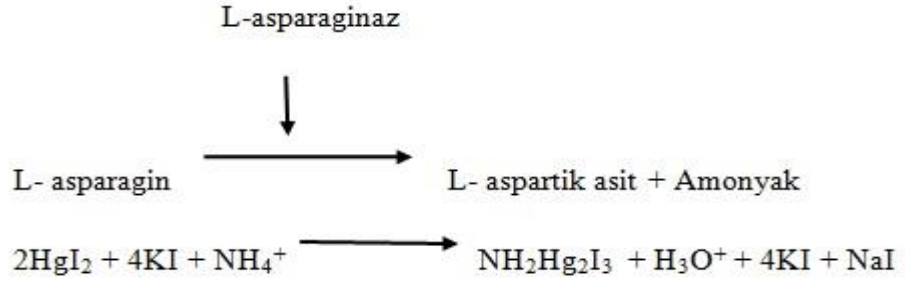
Ayrıca izolatlardan, bir öze dolusu alınarak 100 ml’lik sıvı M9 ortamına ekimleri yapılmıştır. Kültürler 30°C ve 150 rpm’de geliştirilmek üzere üç günlük takibe alınmıştır. Kültürlerdeki L-asparaginaz etkinliğini ölçmek için spektrofotometrik yöntem kullanılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir.

3.2.5. L-asparaginaz aktivitesinin spektrofotometrik yöntemle ölçülmesi

Çalışmamızda enzim aktivite tayini için, spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır.

L-Asparajinaz enzim aktivitesi tayini; Enzim aktivitesi, solüsyondaki amonyak miktarının ölçülmesine dayanan nesslerizasyon ile doğrudan belirlenmiştir (Prakasham *et al.* 2007). Aktivite tayini için aşağıdaki protokol izlenmiştir;

- 50 mM Tris-HCl tamponu – pH 8,6
- Sonlandırma tamponu olarak 1,5 M Trikloroasetik Asit (TCA) solüsyonu
- Substrat olarak 189 mM L-asparajin solüsyonu kullanılmıştır.
- 100 µl fermentasyon sıvısı ile 37°C’de 30 dakika bekletilerek gerçekleştirilmiş
- TCA ilavesi ile reaksiyon durdurulmuştur. 480nm dalga boyunda ölçülen absorbanslar kaydedilmiştir.
- 1 Unit enzim, L-asparaginn’den, 1 dakikada 1 µmol amonyak hidrolize eden enzim miktar olarak tanımlanmıştır.
- L-Asparajinaz enzim aktivitesi U/ml cinsinden hesaplanmıştır (Bilimoria *et al.* 1969; Distasio Pritsa and Kyriakidis 2001; Abdel *et al.* 2002; Mishra 2006).



Enzim aktivitesi aşağıda gösterilen denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\text{Unit/ml enzim} = \text{Salınan NH}_3 (\mu\text{mol}) \times (2,20) / (0,08) \times (30) \times (0,1)$$

2,20 = Aktivite tayininde kullanılan toplam hacim (ml)

0,08 = Spektrofotometre küvetlerine konulan enzim hacmi (ml)

30 = Aktivite tayini süresi (dakika)

0,1 = Kullanılan fermentasyon sıvısı hacmi (ml)

3.2.6. Optimizasyon çalışmaları

İzolatların, L-asparaginaz üretim kapasitelerine bakılmış ve L-asparaginaz verimi en yüksek olan izolatlar belirlenmiştir. Bu izolatların, kültür parametreleri optimize edilerek L-asparaginaz verimliliği artırılmaya çalışılmıştır. Enzim üreten bakterilerden, sekiz tanesi seçilerek yapılan ön çalışmalarda enzim miktarları belirlenmiş en yüksek miktarı veren üç bakteri seçilmek sureti ile optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

Çalışmada optimizasyon parametreleri olarak; karbon kaynağı, pH, glikoz miktarı, azot kaynağı ve inkübasyon süresi kullanılmıştır. Çizelge 3.2’de optimizasyon için belirlenen faktörler ve uygulama seviyeleri gösterilmiştir.

3.2.7. L-asparaginazın saflaştırılması

L-asparaginaz enzimi aşağıdaki protokol izlenerek saflaştırılmıştır.

- L-asparaginaz enzimini saflaştırmak için izolatlar M9 ortamında 48 saat boyunca inkübe edilmiş,
- İnkübasyon sıvısı 4°C, 500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek ortamdaki mikroorganizmalar uzaklaştırılmış,
- Mikroorganizmalar uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen süpernatant %60'lık $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (amonyum sülfat) ile muamele edilerek çöktürülmüş (Amonyum sülfat ortama yavaşça katılarak 4°C'de 12 saat bekletilmiştir),
- 4°C, 10000 rpm'de 20 dk. Santrifüj edilerek proteinler çöktürülmüş,
- Çöken proteinler 50 mM 7.0 pH Tris-HCL tamponu ile çözölmüş,
- Protein çözeltisinden tuzların ve diğer iyonların uzaklaştırılması için üç kez diyaliz işlemi yapılmıştır.

3.2.8. SDS-PAGE analizleri

L-asparaginaz enziminin yaklaşık olarak molekül ağırlığını belirlemek ve saflığını kontrol etmek amacıyla, saflaştırma basamaklarında elde edilen örneklerin SDS-PAGE analizleri Laemmli yöntemine göre yapılmıştır (Laemmli 1970). Aşağıda belirtilen işlem basamakları uygulanmıştır.

- Ayırma jeli için %12'lik, yığma jeli için %5'lik akrilamid jel kullanılmıştır. Elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkanmıştır.
- İki cam plaka birbiri üstüne konularak kısıkaçlarla tutturulmuş ve jel hazırlama cihazına konulmuştur.
- Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle aktarılmıştır. Jel yüzeyinin düzgün olması için saf su ile ince bir tabaka oluşturulmuştur.
- Polimerizasyon bittikten sonra üzerindeki izopropil alkol dökülmüş,

- Daha sonra yığma jel üst yüzeye kadar ilave edilmiş,
- Yaklaşık 45 dakika sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirilmiş,
- Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkanmıştır.
- Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konulmuştur.
- Numuneler her birinde 20 µg enzim olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Kısmi saflaştırılmış enzim, 1/1 oranında numune tamponu katılmıştır.
- Beş dakika boyunca kaynar su banyosunda muamele edilmiştir.
- Numuneler soğutulurken, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulanmıştır.
- Tank kapağı kapatılarak (-) kablo (Anot) ve (+) kablo (katot) yerleştirilmiştir.
- Önce 80 voltluk akım yarım saat geçirildikten sonra akım 120 volta ayarlanarak 2-4 saat oda sıcaklığında tatbik edilmiştir.
- Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarılmıştır.
- Çıkarılan jel, boyama çözeltisine alınarak 24 saat boyanması için beklenmiştir.
- Boyama işleminden sonra yıkama çözeltisiyle yıkanarak fotoğrafları alınmıştır.

3.2.9. İzolatların tanısında kullanılan klasik yöntemler

Klasik yöntemlerde; izolatların koloni morfolojileri, sitolojik şekilleri, Gram boyanma özellikleri ve hareket özellikleri incelenmiştir.

Koloni morfolojilerinin belirlenmesi için; saf kültürlerden ayrı ayrı örnekler alınmış ve 4 fazda çizgi ekim yöntemi ile NA ortamına transfer edilmiştir. 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çıplak gözle (şekil, büyüklük, renk vb.) ve mikroskopla (kenar şekilleri, konveks, konkav vb.) özellikleri incelenmiştir.

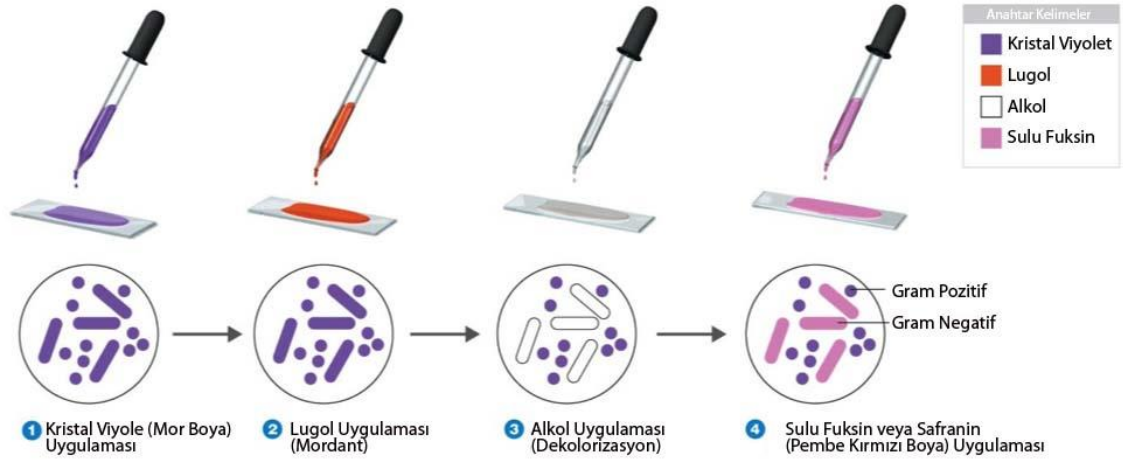
3.2.9.a. Bakterilerin sitolojik özelliklerinin belirlenmesi

Saf kültür olarak izole edilen bakterilerin şekillerini tayin etmek için; ısıyla lam üzerine tespit işlemi uygulanmış ve kristal viyole ile boyanarak hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelenmiştir.

Bakterilerin Gram boyanma özelliğinin belirlenmesi: Gram özelliğini belirlemek için aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

- 24 saatlik genç kültürlerden preparat hazırlanmış,
- Önce kristal viole ile 2 dakika süreyle boyanmış,
- Boyanın fazlası saf su ile giderilmiş,
- Mordan etkisi için 2 dakika süreyle lügol çözeltisi uygulanmış,
- Saf su ile boyanın fazlası giderilmiş,
- 1 dakika süreyle %70 lık etil alkol uygulanarak birinci boyanın dekolorizasyon işlemi gerçekleştirilmiş,
- 2 dakika süreyle safranin ile boyanmış,
- Boyanın fazlası gidermek için saf sudan geçirilmiş,
- Preparat kurutularak 40'lık ve immersiyon objektifleriyle incelenmiş,
- Mor menekşe renkli olanlar Gram pozitif, pembemsi veya kırmızı renkli olanlar ise Gram negatif olarak kaydedilmiştir.

Gram boyama tekniğinin aşamaları Şekil 3.1'de özetlenmiştir.



Şekil 3.2. Gram boyama teknik aşamaları

Hareket testi: Bu amaçla yaş preparasyon tekniği uygulanmıştır. Önce; 2-3 öze dolusu 24 saatlik sıvı bakteri kültürü lam üzerine aktarılmış ve üzerine lamel kapatılmıştır. Lam ve lamel arasında hava kabarcığı oluşmaması için lamelin 45 derece açıyla kapatılmasına dikkat edilmiş ve immersiyon objektifte incelenmiştir.

3.2.9.b. Biyokimyasal testler

KOH (Potasyum-Hidroksit) testi: 24 saatlik bakteri kültürlerinden alınan örnekler, Gram boya ile boyanma durumları araştırılmak üzere KOH testine tabi tutulmuştur. Öncelikle incelenecek olan kültürden bir öze dolusu lam üzerine aktarılacak üzerine KOH çözeltisi eklenmiştir. Öze yardımı ile kültür ve çözeltinin etkileşime geçmesi sağlanmıştır. Eğer karışım sünme şeklinde yavaş bir akma gösterirse bakteri için Gram negatif, eğer sünme yok ise Gram pozitif şeklinde değerlendirilmiştir.

H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) testi: Bakterilerin sahip olduğu katalaz enzimi, ortamdaki hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırır. Sıvı ya da katı besiyerinde geliştirilen, bakteri kültürlerine H₂O₂ ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlemlenebilmesi, hidrojen peroksidin ayrışmasını, dolayısıyla da katalaz enziminin varlığını gösterir. H₂O₂ testini yapmak için; incelenecek kültürden öze ile örnek alınarak

temiz bir lam üzerinde distile su ile süspanse edilmiştir. Bunun üzerine damlalık yardımı ile %30'luk H₂O₂ ilave edilmiştir. Kısa bir karıştırma işlemi sonrasında kabarcıkların çıkışı, testin pozitif olduğunu göstermiştir. Testler 18-24 saatlik kültürlere uygulanmıştır.

3.2.9.c. Moleküler yöntemler

Genomik DNA izolasyonu, EcoPURE Genomic DNA Kit kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde yapılmıştır. Genomik DNA'dan 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması için 27F ve 1391R primerleri kullanılmıştır. PCR (Polimer Zincir Reaksiyonu) ürünleri %1'lik agaroz jelde doğrulandıktan sonra EcoSpin PCR Purification Kit ile saflaştırılarak, her iki primerle çift yönlü olarak ticari bir firma (MEDSANTEK) aracılığıyla okutulmuştur. Elde edilen sekans verileri BioEdit programında birleştirilerek NCBI veri tabanında bilinen türlerle karşılaştırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İzole Edilen Bakteriler

Erzurum Serçeme deresi toprağından, insan dışkısından ve farklı organizmaların sindirim sistemlerinden izole edilen bakteri sayısı ve bakterilere verilen kodlar çizelge 4.1’de verilmiştir.

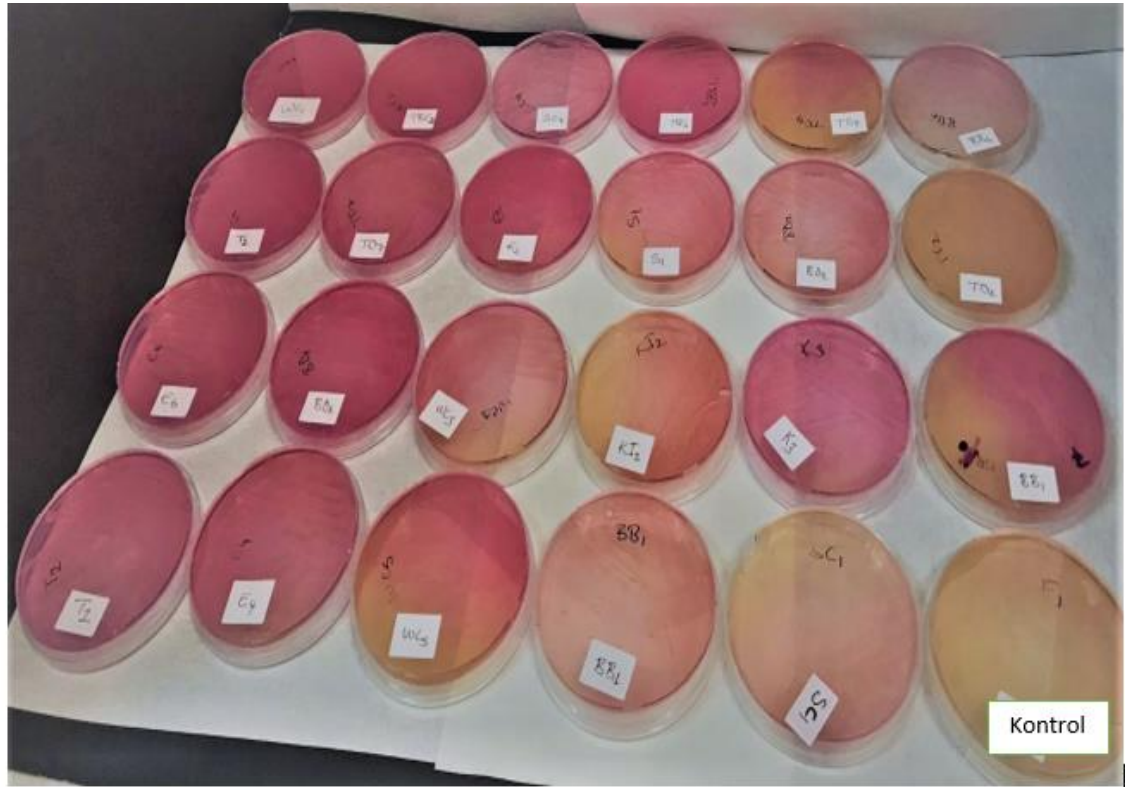
Çizelge 4.1. Çeşitli ortamlardan izole edilen bakteri sayıları ve kodları

Ortam	Bakteri Sayısı	Verilen Kodlar
Toprak	7	TO _{1,2,3,4,5,6,7}
Balık Sindirim Sistemi	12	BB _{1,2,3,4,5,6,7} BD _{1,2,3,4,5}
Tavuk Sindirim Sistemi	9	TB _{1,2} -TD _{1,2} KI _{1,2} - K _{1,2,3}
Sığır Sindirim Sistemi	5	E _{1,2,3,4,5,6}
Çeşitli Böcek Türleri Sindirim Sistemleri	10	S ₁ - T _{1,2} -Ö _{1,2,3,5,5} - B _{1,2,3,4,5,6}
İnsan Dışkısı	5	WC _{1,2,3,4,5}
Solucan Sindirim Sistemi	4	SC _{1,2,3,4}

4.2. L-asparaginaz Enzimi Üretme Yeteneğine Sahip Bakterileri Seçmek İçin Hazırlanan “M9 Ortamı” ve Elde Edilen Sonuçlar

Çalışmada kullanılan bakteriler Erzurum İli Serçeme Deresi toprağından, insan dışkısından ve bazı hayvanların sindirim sistemlerinden izole edilmiştir. İzole edilen

bakteri sayısı 120'dir. Her bir izolatın, L-asparaginaz üretme yeteneğini olup olmadığını belirlemek amacıyla, Bölüm 3.2.3'te içeriği verilen M9 ortamı kullanılmıştır. Bu ortamın başlangıçtaki rengi, açık turuncu renktedir. Şekil 4.1'de gösterildiği gibi; besi ortamını pembe renge boyayan bakteriler için; L-asparaginaz enzimi ürettiği şeklinde değerlendirilme yapılmıştır.



Şekil 4.1. L-asparaginaz sentez kapasitesine sahip izolatların kalitatif tayini

Farklı organizmalardan izole edilen bakteri suşları, M9 sıvı ortamında 24 saat inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda enzim üretimleri ve meydana gelen renk değişimleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. M9 sıvı ortamdaki L-asparaginaz üretim ve renk değişimi

İzolatlar M9 sıvı ortamına ekilerek üç gün boyunca renk değişimleri gözlemlenmiştir. En iyi renk değişimi gözlenen beş bakterinin (WC₃, WC₂, T₁, Ö₅₅, BD₁) üç günlük takip fotoğrafları Şekil 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.3. L-asparaginaz üreten izolatların sıvı besiyerinde üç günlük fotoğrafları

L-asparaginaz sentez kapasitesine sahip olan bakterilerin, kalitatif derecelendirmesi Çizelge 4.2’de sunulmuştur. M9 ortamına ekimi yapılan bakteriler; 30°C’de, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda incelenmiş; 1. Gün renk değişimi olanlar +++, ikinci gün renk değişimi olanlar ++ ve üçüncü gün renk değişimi olanlar + şeklinde derecelendirilmiştir.

Çizelge 4.2. Seçici katı besiyerlerinde bakterilerin katı besi yerindeki L-asparaginaz etkinliği

Sıra no	Bakteri kodu	L-asparaginaz etkinliği	Sıra no	Bakteri kodu	L-asparaginaz etkinliği
1	WC	+++	31	Ö ₁	-
2	WC ₂	+++	32	Ö ₂	+++
3	WC ₃	+++	33	Ö ₃	+++
4	WC ₄	+	34	Ö ₅₅	++
5	WC ₅	++	35	T ₁	++
6	E ₁	+++	36	T ₂	-
7	E ₂	++	37	S ₁	+++
8	E ₃	+++	38	SC ₁	-
9	E ₄	++	39	SC ₂	+++
10	E ₅	+++	40	SC ₃	-
11	TBE ₁	+++	41	SC ₄	+++
12	TBE ₂	+++	42	B ₁	+++

Çizelge 4.1. (devam)

13	TD ₁	-	43	B ₂	-
14	TD ₂	+++	44	B ₃	+++
15	K ₁	-	45	B ₄	+++
16	K ₂	-	46	B ₅	+++
17	K ₃	+++	47	B ₆	+++
18	KI ₁	+++	48	TO ₁	-
19	KI ₂	+++	49	TO ₂	+++
20	BB ₁	++	50	TO ₃	++
21	BB ₂	-	51	TO ₄	++
22	BB ₃	+++	52	TO ₅	-
23	BB ₄	+++	53	TO ₆	+
24	BB ₅	-	54	TO ₇	+++
25	BB ₆	++	55	TO ₈	+++
26	BB ₇	++	56	E6	+++
27	BD ₁	+++			
28	BD ₂	+			
29	BD ₃	+++			

Çizelge 4.1’de gösterildiği üzere çeşitli hayvansal organizmaların sindirim sistemlerinden elde edilen 56 izolatın kalitatif olarak L-asparaginaz aktiviteleri değerlendirilmiş ve sonuç olarak; 30 izolatın L-asparaginaz aktivitesinin çok iyi (+++), 10 tanesinin orta derecede (++) ve 3 tanesinin ise düşük düzeyde (+) oldukları saptanmıştır. Böylece 56 izolattan 43 tanesinin L-asparaginaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Öte yandan geriye kalan 13 izolatta ise L-asparaginaz aktivitesi tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.1’de belirtilen bakterilerin, 24 saatlik aktif kültürleri kullanılarak KOH ve H₂O₂ testleri yapılmış sonuçlar çizelge 4.3’te verilmiştir.

Çizelge 4.3. İzole edilen bakterilerin KOH ve H₂O₂ test sonuçları

Bakteri kodu	KOH	H ₂ O ₂	Bakteri kodu	KOH	H ₂ O ₂	Bakteri kodu	KOH	H ₂ O ₂
WC ₁	Gram(+)	Katalaz +	BB ₆	Gram(+)	Katalaz +	TO ₂	Gram(+)	Katalaz +
WC ₂	Gram(+)	Katalaz +	BB ₇	Gram(+)	Katalaz +	TO ₃	Gram(-)	Katalaz +
WC ₃	Gram(-)	Katalaz +	BD ₁	Gram(+)	Katalaz +	TO ₄	Gram(-)	Katalaz +
WC ₄	Gram(-)	Katalaz -	BD ₂	Gram(-)	Katalaz -	TO ₅	Gram(-)	Katalaz +
WC ₅	Gram(-)	Katalaz +	BD ₃	Gram(+)	Katalaz +	TO ₆	Gram(+)	Katalaz +
E ₁	Gram(-)	Katalaz +	BD ₅	Gram(+)	Katalaz +	TO ₇	Gram(+)	Katalaz +
E ₂	Gram(-)	Katalaz +	Ö ₁	Gram(-)	Katalaz +	TO ₈	Gram(+)	Katalaz +
E ₃	Gram(-)	Katalaz +	Ö ₂	Gram(+)	Katalaz +	E ₆	Gram(+)	Katalaz +
E ₄	Gram(+)	Katalaz +	Ö ₃	Gram(-)	Katalaz +			

Çizelge 4.3. (devam)

E₅	Gram(+)	Katalaz +	Ö₅₅	Gram(-)	Katalaz +
TBE₁	Gram(-)	Katalaz +	T₁	Gram(-)	Katalaz +
TBE₂	Gram(-)	Katalaz +	T₂	Gram(+)	Katalaz +
TD₁	Gram(-)	Katalaz +	S₁	Gram(+)	Katalaz +
TD₂	Gram(-)	Katalaz +	SC₁	Gram(-)	Katalaz +
K₁	Gram(-)	Katalaz +	SC₂	Gram(+)	Katalaz +
K₂	Gram(-)	Katalaz +	SC₃	Gram(+)	Katalaz +
K₃	Gram(-)	Katalaz +	SC₄	Gram(+)	Katalaz +
KI₁	Gram(-)	Katalaz +	B₁	Gram(-)	Katalaz +
KI₂	Gram(-)	Katalaz +	B₂	Gram(-)	Katalaz +
BB₁	Gram(+)	Katalaz +	B₃	Gram(-)	Katalaz +
BB₂	Gram(+)	Katalaz +	B₄	Gram(+)	Katalaz +
BB₃	Gram(+)	Katalaz +	B₅	Gram(-)	Katalaz +
BB₄	Gram(+)	Katalaz +	B₆	Gram(-)	Katalaz +
BB₅	Gram(+)	Katalaz -	TO₁	Gram(-)	Katalaz -

Çizelge 4.3'te gösterildiği üzere bakterilerin Gram özelliklerine ve katalaz aktivitelerine bakılmış; elde edilen verilere göre 26 bakterinin Gram pozitif, 30 bakterinin ise Gram negatif olduğu saptanmıştır. Yapılan H₂O₂ testine göre ise, 52 bakterinin katalaz pozitif, 4 bakterinin ise katalaz negatif olduğu belirlenmiştir.

4.3. İzole Edilen Bakterilerin L-asparaginaz Aktiviteleri

M9 besi ortamında, kalitatif olarak enzim üretim miktarları derecelendirilen bakterilerden renk değişimi iyi derece olanlar seçilmiştir (Çizelge 4.2). Enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle 480 nm’de ölçülmüş eldedilen absorbans değerleri

Unit/ml enzim = Salınan NH₃ (μmol) x (2.20) / (0,08) x (30) x (0,1)
forfmülü kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.4. L-asparaginaz üretimi en iyi olan izolatların 480 nm’deki enzim aktivite değerleri

Sıra No	İzolatın Kodu	L-asparaginaz aktivitesi U/ml protein
1	BB ₆	17,41
2	Ö ₅₅	64,35
3	E ₄	108,1
4	TO ₂	52,47
5	S ₁	118,8
6	WC ₃	81,51
7	T ₁	101,48
8	BD ₁	125
9	E ₁	21,78
10	KI ₂	70
11	K ₃	113
12	T ₂	33,17
13	TO ₄	99,99
14	TBE ₁	140
15	BB ₄	108,1
16	TO ₇	106,01
17	E6	148
18	WC	165
19	SC4	151
20	BB₁	156,92
21	BD ₂	137,04
22	SC ₁	118
23	TBE ₂	129
24	WC ₅	138,2

Elde edilen sonuçlara göre; E4, S1, T1, TO4, TBE1, BB4, TO7, E6, WC, SC4, BB1, BD2, SC1, TBE2, WC5 ve T2 kodlu izolatların L-asparaginaz enzim aktivitelerinin yüksek olduğu görülmüştür.

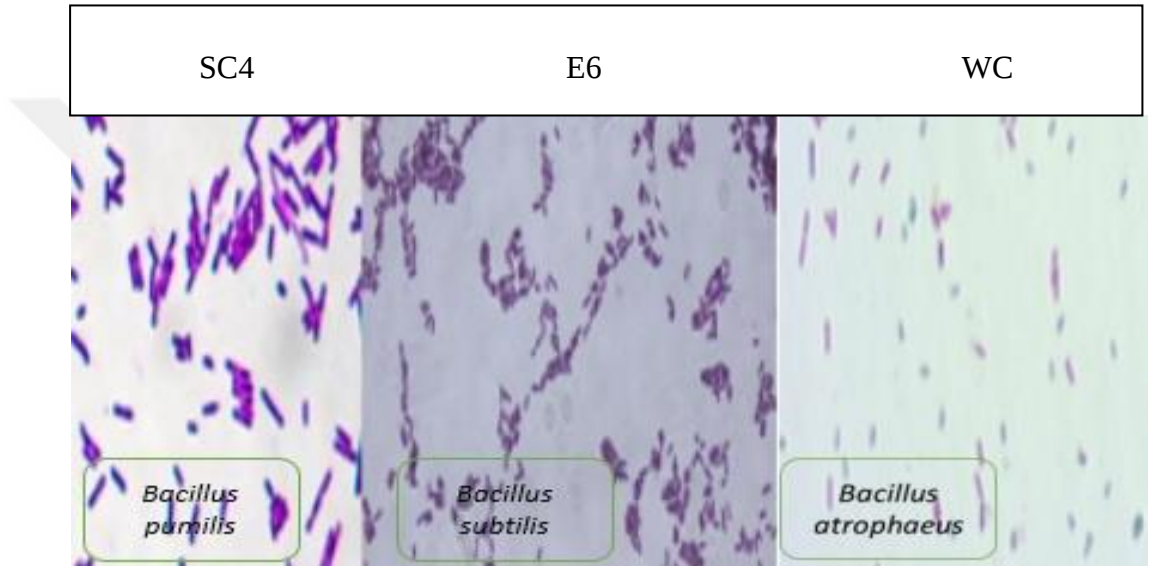
4.4. L-Asparaginaz Aktivitesi Yüksek Olan İzolatların Tanı ve Karakterizasyonu İçin Yapılan Analiz Sonuçları

L-asparaginaz enzim üretme yeteneği, spektrofotometrik olarak tespit edilmiş, en iyi üretim yapan sekiz bakterinin (WC, WC₅, SC4, E₂, E₄, E₆, BB₇, TBE₁) şekil, Gram boyanma özelliği, katalaz enzimi bulundurup bulundurmadığı ve hareket özelliği incelenerek, sonuçlar Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. L-asparaginaz üretme yeteneği en iyi olan bakterilerin kültürel, morfolojik ve mikroskopik bazı özellikleri

Bakteri Kodu	Koloni Morfolojisi	Hücre Morfolojisi	Gram özelliği	H ₂ O ₂ Testi	Hareket
WC	Parlak Bej	Basil	+	+	+
SC4	Mat Beyaz	Basil	+	+	+
E ₂	Parlak Beyaz	Kok	-	+	-
E ₄	Şeffaf	Kok	+	+	-
E ₆	Parlak Krem	Basil	+	+	+
BB ₇	Pudra Rengi	Kok	-	+	-
TBE ₁	Açık Sarı	Kok	-	+	-
WC ₅	Mat Beyaz	Basil	-	+	+

Elde edilen veriler sonucunda etkili bulunan bakterilerin 4 tanesinin (WC, SC4, E4 ve E6) Gram pozitif olduğu, 4 tanesinin (E2, BB7, TBE1 ve WC5) ise Gram negatif olduğu belirlenmiştir. Sekiz bakteride de katalaz enzimi varlığı H₂O₂ testi ile tespit edilmiştir. WC, SC4, E6 ve WC5 kodlu bakterilerin hareketli olduğu da görülmüştür. Elde edilen veriler ışığında üç bakteri ile (WC, SC4, E6) deneysel çalışmalara devam edilmiştir. Öncelikle bu üç bkrinin mikroskop görüntüleri alınarak Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. L-asparaginaz aktivitesi en iyi olan üç izolatın mikroskop görüntüleri

4.5. Optimizasyon Çalışmalarının Sonuçları

Optimizasyon çalışmaları için L-asparaginaz aktivitesi en yüksek üç izolat (WC, SC4, E6) seçilmiştir. Seçilen izolatlar, tablo 3.1'de verilen parametreler çerçevesinde optimize edilmişlerdir. Enzim aktivite tayinleri spektrofotometrik olarak ölçülerek tablolar halinde gösterilmiştir.

4.5.1. Karbon kaynağı optimizasyonu

Seçilen bakterilerin karbon kaynaklarını optimize etmek amacı ile besiyerlerine karbon kaynağı olarak; glikoz, sükroz, laktoz, fruktoz ve mannitol eklenmiş, 24 saat inkübe edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı karbon kaynaklarının L-asparaginaz aktivitesi üzerine etkisi

Bakteri Kodları	Karbon (C) Kaynakları				
	Glikoz	Sükroz	Laktoz	Fruktoz	Mannitol
SC4	151 U/ml	50,7 U/ml	54,5 U/ml	45,5 U/ml	50,3 U/ml
WC	165 U/ml	74,25 U/ml	28,22U/ml	14,8 U/ml	70 U/ml
E6	147,5 U/ml	15,67 U/ml	15,2U/ml	118 U/ml	40,1 U/ml

Elde edilen sonuçlara göre L-asparaginaz için en uygun karbon kaynağı Glikozdur. Glikoz varlığında SC4 151 U/ ml, WC 165 U/ml ve E6 147,5 U/ml L-asparaginaz aktivitesi göstermiştir. Yapılan çalışmada E6 kodlu İzolatın hem glikoz varlığında hem de fruktoz varlığında yüksek aktivite gösterdiği kaydedilmiştir.

4.5.2. Glikoz miktarı optimizasyonu

M9 besi ortamının glikozu, 4 farklı miktarda (1, 2, 3 ve 4 g/l) değiştirilerek denenmiş ve 24 saatlik kültürlerde meydana gelen renk değişimleri fotoğraflanmıştır. Spektrofotometre ile ölçülen değerler Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. L-asparaginaz üretiminde Glikoz miktarının etkisi

Bakteri Kodları	Glikoz Miktarı (g/L)			
	1 g	2 g	3 g	4 g
SC4	43,89 U/ml	149 U/ml	44,65 U/ml	41 U/ml
WC	51 U/ml	165 U/ml	19,85 U/ml	19,14 U/ml
E6	60,72 U/ml	148,5 U/ml	23,05 U/ml	21,36 U/ml

Çalışmamızda M9 besi ortamına farklı miktarlarda (1g, 2g, 3g ve 4g) glikoz katılmış ve L-asparaginaz aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek aktivite 2g glikoz eklendiğinde ölçülmüştür. Ölçülen sonuçlara göre; SC4 149 U/ml, WC 165 U/ml ve E6 148,5 U/ml aktivite göstermiştir.

4.5.3. Azot kaynağı optimizasyonu

L-asparagin'e ek olarak M9 ortamına farklı azot kaynakları eklenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. L-asparaginaz aktivitesinin azot kaynaklarına göre değişimi

Bakteri Kodları	Azot kaynağı		
	Pepton	NH₄PO₄	Tavuk Tüyü Peptonu
SC4	65,75 U/ml	63,12 U/ml	79,28 U/ml
WC	62 U/ml	43 U/ml	67,2 U/ml
E6	79 U/ml	73,59 U/ml	81,3 U/ml

Elde edilen sonuçlara göre en iyi enzim aktivitesi tavuk tüyü peptonu kullanıldığında gözlenmiştir. Tavuk tüyü peptonu kullanıldığında elde edilen ölçüm sonuçları; SC4 79,28 U/ml, WC 67,2 U/ml, E6 81,3 U/ml şeklindedir.

4.5.4. L-asparaginaz üretiminde pH optimizasyonu

Enzim aktivitesinin en iyi olduğu pH derecesini belirlemek amacı ile 5 farklı pH'ta (5, 6, 7, 8 ve 9) besi ortamları hazırlanmış ve 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. L-asparaginaz aktivitesinin farklı pH'larda elde edilen ölçüm sonuçları

Bakteri Kodları	pH				
	5	6	7	8	9
SC4	77,2 U/ml	80,67 U/ml	150,2 U/ml	124,6 U/ml	82 U/ml
WC	63,3 U/ml	121,41 U/ml	165 U/ml	93,85 U/ml	70 U/ml
E6	70,5 U/ml	84,22 U/ml	147 U/ml	98,3 U/ml	76,2U/ml

L-asparaginaz enzim aktivitesi üzerine, pH derecesinin etkisini araştırdığımız çalışmada en yüksek enzim aktivitesi pH 7'de ölçülmüştür. Elde edilen ölçüm sonuçlarına göre pH 7'de; SC4 150,2 U/ml, WC 165 U/ml ve E6 147 U/ml enzimaktivitei göstermiştir.

4.5.5. Zaman optimizasyonu

İzolatların enzim aktiviteleri üç gün boyunca takip edilmiş ve spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

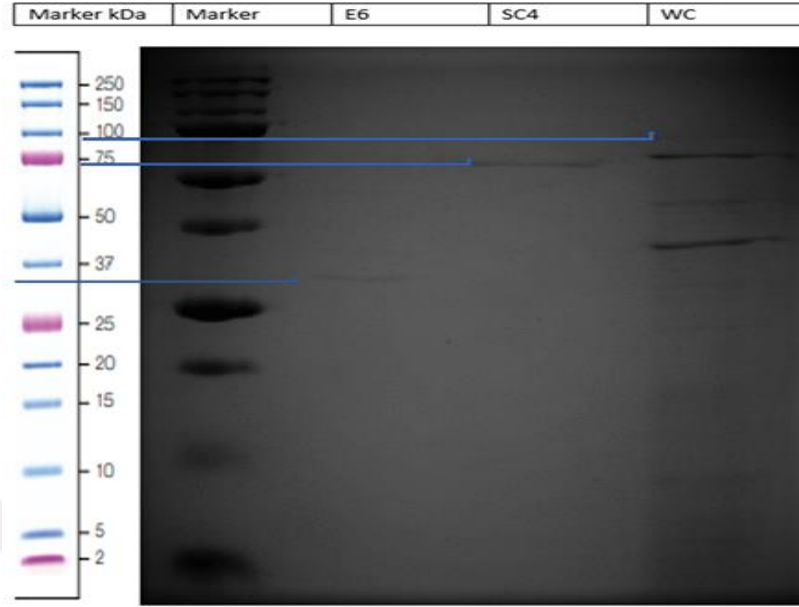
Çizelge 4.10. L-asparaginaz aktivitesinin günlere göre değişimi

Bakteri Kodları	Gün		
	1	2	3
SC4	87,29 U/ml	150 U/ml	90,6 U/ml
WC	78,91 U/ml	165 U/ml	83,34 U/ml
E6	94,22 U/ml	147 U/ml	80,52 U/ml

Yapılan ölçüm sonuçlarına göre inkübasyon süresinin 2. gününde (48 saat) enzim aktivitesi en yüksek değerde ölçülmüştür. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda yapılan ölçümlere göre; SC4 150U/ml, WC 165 U/ml ve E6 147 U/ml L-asparaginaz aktivitesi göstermiştir.

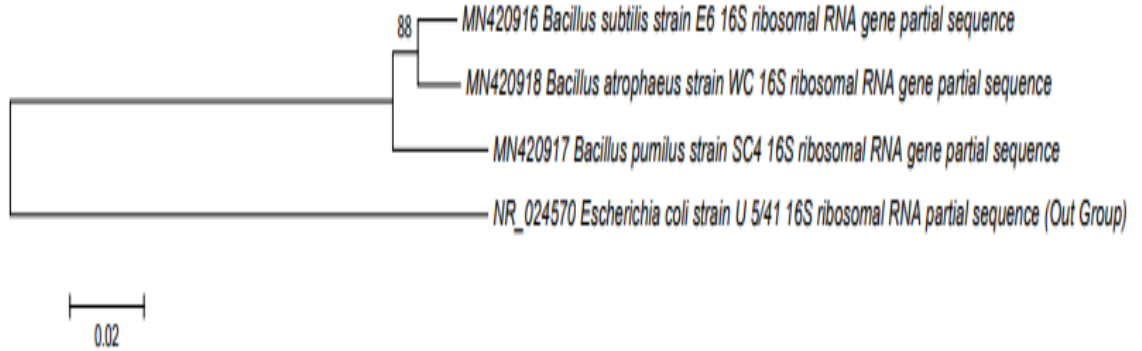
4.6. L – asparaginazın Kısmı Saflaştırılması ve SDS - PAGE Sonuçları

Çalışmamızda kullanılan bakterilerin ürettiği L-asparaginaz enzimlerinin, molekül ağırlıkları sırasıyla; WC;100 kDa, E6; 35 kDa ve SC4; 75 kDa olup SDS- jel görüntüleri Şekil 4.5’te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. L-asparaginazın SDS jel görüntüleri

4.7. L – asparaginaz Üreten Mikroorganizmaların Moleküler Tanı Sonuçları



Şekil 4.6. L-asparaginaz üreten türlerin evrimsel analizi

Evrimsel analiz, Neighbor-Joining metodu kullanılarak elde edilmiştir (Saitou and Nei 1987). Toplam dal uzunluğu 0.28631952 olan optimal bir filogenetik ağaç gösterilmiştir. İlişkili taksonların bootstrap testinde (500 kopya) bir araya getirildiği kopya ağaçların yüzdesi, dalların yanında gösterilmiştir. Ağaç, filogeninin çıkarımında kullanılan evrimsel uzaklıklarla aynı birimdeki dal uzunlukları ile ölçeklendirilmiştir (Felsenstein et

al. 1985). Evrimsel uzaklık, Maximum Composite Likelihood metod (Tamura *et al.* 2004) kullanılarak hesaplanmış ve alan başına baz yer değiştirme sayısının birimlerinde bulunmaktadır. Bu analiz 4 nükleotid dizisini içermektedir. Sahip olunan kodon konumu birinci+ikinci+üçüncü+kodlanmayan şeklindedir. Boşluklar ve hatalı veri içeren tüm konumlar elimine edilmiştir. Evrimsel analizler MEGA6'da yapılmıştır (Tamura *et al.* 2013). *E.coli* dış grup olarak seçilmiştir.

4.7.1. MN420916 *Bacillus subtilis* suşu E6 16S ribozomal RNA geni, kısmi sekans

ATGCGGCGTCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCT
GATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGAC
TGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGC
ATGTGTTTCACAAAACATTAAAAGGGGTGTGCTTCCGGCTACCACTTACAGA
TGGAACCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCCACCAAGCCA
ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAA
AGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTG
ACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCA
GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC
ATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGAC
TCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGG
GGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG
AGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT
CTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTTTCGGGGGCAGA
GTGACAGGTGGTGTCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCATTGATCTTAGTTGCCAGCCATCCAGTTGG

GCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGGTGTGGGATGAC
 GTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAC
 AGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTAAAGCCAATCCCACAAATCTGTT
 CTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTA
 GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG

4.7.2. MN420917 *Bacillus pumilus* suşu SC4 16S ribozomal RNA geni, kısmi sekans

CCGGCAGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGA
 TGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTG
 GGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCAT
 GGTTC AAGGATGAAAGACGGCTCCGGCTGTTCACCTTAGCAGATGGATCCCG
 CGGCGCATTAGGCTAGGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACCGATG
 CGTAGCCGACCTGAGGAGGGGTGGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAATGGACGA
 AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA
 GCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGAC
 GGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGG
 CGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATT
 GGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTA
 GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTC
 TCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGG
 GTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGA
 GTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
 CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
 TTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCTTCGGGGACAGAGT
 GACAGGTGGTGCATGGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTTGGGTTT
 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTTGCCAGCCAATTAGTT
 GGGCACCTCTAAGGTGACTGCCGATTGACCAAACCGGAGGAAGGTGGGAAT

GACGGATTCCAAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA
CAATGGACAGAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATA
AATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGA
ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG

4.7.3. MN420918 *Bacillus atrophaeus* suşu WC 16S ribozomal RNA geni, kısmi sekans

CGCAGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATG
TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGG
ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGG
TTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGGATTGGAATCCCGG
CGGCGCATTTAGGCTAGTAGGTGAAGTAACGACTCAACAAGGCAACGATGC
GTAGCCGGACCTGAGGAGGGTGATCGGCCACCACTGGGACTGAGACACGAC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG
TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCT
CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGG
TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCG
GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG
GAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC
TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGT
TTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
CGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACATCCCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTTCGGGGGCAGAGTG
ACAGGTGGTGCATGGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAG
TCCCGGCAACGGAGCGCAACCATTGAATCTTAGATGCCAGCATCCAGTTGG
GCACTCTAAGGTGAACTGCCCCGATGAACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG

ACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
ACAGAACAAAGGGCAGCGAGACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCT
GTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGC
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. İzole Edilen Bakteriler

Bir insanın yaklaşık 100 trilyon hücreden oluştuğu genel bir bilgidir, bağırsak florası ise bu sayıdan 10 kat daha fazladır (Çetin vd 2015). Bağırsak florasındaki mikroorganizmalar hem fizyolojik hem de hastalıklara karşı direnci etkileyen ekolojik bir topluluktur. Bağırsak florasında yaklaşık 500 çeşit mikroorganizma vardır. Bu organizmalar; *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* gibi cinsleri içermektedir (Lazupone et al. 2013). Sığırlarda bağırsak florası mikroorganizma açısından zengin bir içeriğe sahiptir. Sığır bağırsak mikroflorasında; *Prevotella*, *Treponema*, *Succinoclasticum*, *Ruminococcus*, *Acetivomaculum*, *Mogibacterium*, *Butyrivibrio*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Staphylococcus* gibi cinsler bulunur (Mao et al. 2015). Tavuk bağırsak florasında ise; *Lactobacillus*, *Candidatus Arthromitus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Shigella* ve *Clostridium* (Asore et al. 2015) cinsleri ve *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae* ve *Bacteroidaceae* familyalarına ait türler bulunur. Balık bağırsak mikroflorasında; *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* ve *Tenericutes* cinslerine ait türler bulunur. Böcekler mikroflora bakımından oldukça zengin organizmalardır. Çok çeşitli mikrobiyota topluluğuna sahiptirler. Bunlardan bazıları; *Bacteroides*, *Acinobacteria muciniphila*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Shigella*'dır. Toprak solucanında, sindirim sistemleri iki açıklığa sahiptir. Sindirim sistemlerinde, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Clostridium* gibi mikroorganizmalar bulunur. *Pseudomonas aeruginosa* G1, *Stenotrophomonas maltophilia* G2, *Bacillus atrophaeus* G3, *Citrobacter amolonaticus* G4 ve *Acinetobacter lwoffii* G5 gibi bakteriler hamamböceği (*Blatta orientalis*) bağırsak florasından izole edilmiştir (Ozda et al. 2016). Orthoptera, Dermaptera, Mantodea and Hymenoptera takımlarına ait farklı böcek türlerinden *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Flavimonas* ve *Rhodococcus* gibi pestisit parçalayan bakteriler izole edilmiştir (Gür et al. 2016).

Çalışmamızda kullandığımız L-asparaginaz üreten ve yüksek aktiviteye sahip olan bakterilerin 16sDNA sonuçları; insan gaytasından izole edilen WC; *Bacillus atrophaeus*, sığır sindirim sisteminden izole edilen E6; *Bacillus subtilis* ve toprak solucanı sindirim sisteminden izole edilen SC4; *Bacillus pumilus*'tur. Literatürde *Bacillus* türlerinin asparaginaz ürettiğine dair oldukça çok çalışma bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; Nazemi and Miri Nargesi (2013); Jha *et al.* (2012); Makky *et al.* (2013) Kamble *et al.* (2012) *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Serratia spp.*'tir. Çeşitli organizmaların sindirim sisteminden izole ettiğimiz bakteriler *Bacillus* cinsine ait bakteriler olup literatür çalışmalarına bu yönüyle uygunluk göstermektedir

Basillus cinsinin yanı sıra; Peterson RE. *et al.* (1969)'da, *Aerobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Photobacterium*'un, Dejong PJ (1972) *Streptomyce*'un, Tosa T. (1971)'de *Proteus*'un, Kafkewitz D, Goodman D (1974)'te *Vibrio*'un, Sarquis M *et al.* (2004)'te *Aspergillus*'un, Ghoshoon *et al.* (2008)'de *E.coli*'nin; Usha *et al.* (2011)'de *Streptomyces parvulus*'un; Gupta *et al.* (2009); Dharmaraj (2011); Dhanam Jayam ve Kannan (2014)'te *Streptomyces*'lerin L-asparaginaz üretim potansiyeline sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Bu türler içerisinde *E. coli* ve *Erwinia sp.* (Dejong PJ 1972) anti-tümör ve anti-lösemi ajanı olarak kullanılmıştır. Asparaginazın söz konusu bu iki kaynaktan tıbbi kullanımı, immünolojik tepkiler nedeniyle sınırlıdır. Bununla birlikte, uzun süreli kullanımda aşırı duyarlılığa neden olarak alerjik reaksiyonlara ve anafilaksiye neden olabilir. Bu yüzden yeni immünolojik özelliklere sahip L-asparaginaza ihtiyaç vardır. Bu kısıtlamanın üstesinden gelmek için L-asparaginaz'ın yeni bakteriler tarafından üretimi keşfedilebilir. Bu nedenlerden dolayı farklı antijenik özelliklere sahip L-asparaginaz üreten yeni suşlar bulmak için çaba harcanmıştır.

Uygun miktarda L-asparaginaz üretmek, daha yüksek enzim üretimine sahip yeni mikrobiyal kaynaklar keşfedilerek veya bilinen mikrobiyal kaynaklar için ortam bileşenlerini değiştirilerek (seçme, ekleme veya çıkarma yoluyla) gerçekleştirilebilir. Bu çalışmada kullanılan bakteriler, farklı hayvansal organizmaların sindirim sisteminden izole edilmiş ve L-asparaginaz üretme yetenekleri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz suşların

(E6 *Bacillus subtilis*, WC *Bacillus atrophaeus* ve SC4 *Bacillus pumilus*) yüksek L-asparaginaz aktivitesine sahip oldukları gözlemlenmiştir. İzole edilmiş *Bacillus subtilis*'in ABD'de önemli miktarda hücre dışı L-asparaginaz üretme kabiliyetine sahip olduğu kanıtlanmıştır (Shukla and Mandal 2013). Ayrıca Singh and Srivastava (2012) yaptıkları çalışmada *Bacillus* cinsine ait 17 türün L-asparaginaz üretme yeteneğine sahip olduklarını göstermişlerdir. Bu 17 tür için optimizasyon çalışmaları yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada elde ettikleri optimizasyon verileri bu çalışmadaki optimizasyon verileri ile benzerlik göstermekle birlikte (7.5 pH, 38 saat inkübasyon süresi, karbon kaynağı glikoz ve sıcaklık 30-37°C) *Bacillus pumilis* ve *Bacillus subtilis* bu iki çalışmada kullanılan ortak türlerdir.

5.2. L-asparaginaz Enzimi Üretme Yeteneğine Sahip Bakterileri Seçmek İçin Hazırlanan “M9 Ortamı” ve Elde Edilen Sonuçlar

Enzimler biyolojik katalizörlerdir. Tanımlanmış olan birçok enzim, biyoteknolojik öneme sahiptir. L-asparaginaz enzimi endüstride kullanılan önemli bir enzimdir. Bu enzim; lösemi, Hodgkin hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan güçlü teröpatik bir ajandır (Erva *et al.* 2017). Yüksek antioksidan özelliğe sahip olmasından dolayı sağlık alanı başta olmak üzere gıda endüstrisi kozmetik ve birçok alanda kullanılmaktadır. Özellikle *E. coli* ve *Erwinia* sp. gibi bakterilerin L-asparaginaz ürettiği literatür çalışmalarında yer almaktadır. Bu bakterilerin yanı sıra *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter*, *Thermus thermophilus* ve *Actinomycetes* türlerinin de L-asparaginaz ürettikleri bilinmektedir (Sudhir *et al.* 2012; Ghosh *et al.* 2013; Mahajan *et al.* 2014; Erva *et al.* 2017).

Hayvansal organizmaların sindirim sistemi, çeşitli biyoteknolojik üretimler için gerekli mikroorganizma kaynağı olarak çok elverişlidir. Bu nedenle, L-asparaginaz üretme yeteneğine sahip bakteriler izole etmek için, bağırsak ortamı akla gelen zengin içerikli ortamlardan biridir. Bu zengin çeşitlilik çalışmamıza büyük katkı sağlamıştır. Çalışmamızda solucan, böcek sindirim sisteminden ve insan dışkılarından izole edilen

bakterilerin (SC4, E6 ve WC1) yüksek miktarda L-asparaginaz ürettikleri ve aynı zamanda etkinliklerinin de yüksek olduğu belirlendikten sonra optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Yaptığımız çalışmada da 100'den fazla bakteri bulunmuştur. Ancak çalışmamızın amacı doğrultusunda, seçici ortam olarak M9 ortamı kullanılmış ve L-asparaginaz üreten 43 farklı bakteri izole edilmiştir (Çizelge 4.1). İzole edilen bakterilerin sitolojik ve biyokimyasal bazı özelliklerine bakılarak bu bakterilerin her birinin farklı tür olma olasılığı varsayılmıştır (Çizelge 4.3). M9 ortamı kullanılarak izole ettiğimiz bakterilerden 8 tanesinin (WC, WC₅, SC4, E₂, E₄, E₆, BB₇, TBE₁) yüksek L-asparaginaz aktivitesine sahip olduğu spektrofotometrik ölçümler sonucunda görülmüştür. Ayrıca seçilen üç bakteri için (WC, SC4 VE E₆), SDS-PAGE analizleri yapılarak, ürettikleri L-asparaginaz enziminin yaklaşık olarak moleküler ağırlığı da belirlenmiştir.

5.3. İzolatların L-asparaginaz Aktivitelerinin Karşılaştırılması

L-asparaginaz üreten mikroorganizmalar, fenol kırmızısı ve azot kaynağı olarak L-asparagin içeren M9 ortamı kullanılarak izole edilmiştir. Ortamın renginin değiştiği mikroorganizmalar L-asparaginaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Doriya and Kumar 2016). Çalışmamızda hayvansal organizmaların bağırsaklarından izole ettiğimiz mikroorganizmaların 43'ünün L-asparaginaz pozitif olduğu, M9 besi ortamında meydana gelen renk değişimlerine bakılarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Sıvı M9 ortamına ekilen 43 mikroorganizmanın, L-asparaginaz aktivitesini, kantitatif olarak belirlemek amacı ile kültür süpernatantında Nessler reaktifi kullanılarak oluşan amonyak miktarının spektrofotometrik ölçümü yapılmıştır. Spektrofotometrik ölçümlerin sonucuna göre (Çizelge 4.4), sekiz bakteride L-asparaginaz etkinliğinin yüksek olduğu belirlenmiştir. İnsan dışkılarından iki (WC ve WC₅), inek bağırsağından üç (E₂, E₄ ve E₆), alabalıktan bir (BB₇), tavuk bağırsağından bir (TBE₁) ve solucan bağırsağından izole edilen bir (SC4) bakterinin yüksek L-asparaginaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sekiz bakterinin sitolojik ve biyokimyasal bazı özelliklerine bakılmıştır (Çizelge 4.5).

Optimizasyon çalışmaları için sekiz bakteri içinden aktivitesi en yüksek üç bakteri seçilmiştir (E6, SC4, WC).

5.4. Optimizasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

L-asparaginaz üretiminde, en uygun şartları ve en uygun besin kaynaklarını belirlemek için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Her organizma maksimum enzim üretimi için kendine özel koşullar ister. Bu nedenle optimum koşullar farklı organizmalar için farklı olabilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz türler, aynı cinse ait olduklarından maksimum enzim üretim koşulları benzerlik göstermektedir.

5.4.1. Farklı karbon kaynaklarının L-asparaginaz üretimi için karşılaştırılması

Tüm canlılar gibi, mikroorganizmalar da enerji dönüşümü için karbon kaynağına ihtiyaç duyarlar. Bakterilerin kültür ortamına ilave edilen farklı karbon kaynakları bakterilerin biyokimyasal aktivitelerini etkilemektedir. Dolayısıyla kültür ortamına konulan karbon kaynakları L-asparaginaz enzim aktivitesini de etkilemektedir. Birçok organizma gibi bakteriler de öncelikle karbon kaynağı olarak glikoz kullanmaktadırlar (Bren *et al.* 2016; Erva *et al.* 2017). Literatür çalışmalarında çoğu bakteri için ürettikleri L-asparaginazın en iyi etkinlik gösterdiği karbon kaynağının, glikoz olduğu belirlenmiştir (Moorthy *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2012). *Bacillus subtilis* türü ile yapılan çalışmada karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığında yüksek verimlilik elde edilmiştir. Singh and Srivastava (2012) farklı *Bacillus* türleri için yaptıkları optimizasyon çalışmasında en iyi aktivitenin glikoz varlığında gerçekleştiğini göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmada; karbon kaynaklarını optimize etmek üzere, glikoz, fruktoz, maltoz, sükroz ve mannitol kullanılmıştır (Çizelge 4.6). Yapılan çalışmalar sonunda en iyi aktivitenin karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığında gerçekleştiği görülmüştür. Karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığında; SC4 151 U/mg, WC 165 U/mg, E6 147,5 U/ml olarak ölçülmüştür. Bulgularımız literatür çalışmalarıyla uygunluk göstermektedir.

5.4.2. Glikoz miktarının L-asparaginaz üretimine etkisi

Fermentasyon sıvısında bulunan maddeler mikroorganizmaların büyüme, gelişme ve hücrel yapıların sentezlenmesinde görev alır. Ortamdaki karbon kaynağı öncelikle büyüme ve gelişme için kullanılır (Gottschalk 2012; Erva *et al.* 2017). Koliform bakterilerden olan *Citrobacter*ler, L-asparaginaz enzimini üretmektedirler. Hadaspar *et al.* (2010) yaptıkları çalışmada 1,5 g/L glikoz miktarında bu bakterilerin L-asparaginaz aktivitesinin en yüksek olduğunu bulmuşlardır. Yaptığımız çalışmada da glikoz miktarı optimizasyonu için M9 ortamına 1g, 2g, 3g ve 4g glikoz eklenerek sonuçlar kaydedilmiştir (Çizelge 4.7). En iyi aktivite orijinal M9 ortamında da belirtilen miktar olan, 2g glikoz katıldığında gözlemlenmiştir. Üç bakteri için de optimum glikoz miktarı 2g'dır. Optimum glikoz miktarını belirlemek için yapılan çalışmada; SC4 149 U/ml, WC 165 U/ ml ve E6 148,5 U/ml olarak ölçülmüştür. Bunun sebebi ise ortamdaki karbon kaynağının öncelikli olarak büyüme ve gelişme için kullanımı olabilir. Ayrıca izolatlarımızın aynı karbon kaynağı ve miktarında L-asparaginaz enzim aktivitesinin yüksek olması da aynı cinse ait bakteriler olmasından dolayı olabilir (Şekil 4.6).

5.4.3. Farklı azot kaynaklarının L-asparaginaz üretimi için karşılaştırılması

Proteinlerin, nükleik asitlerin, enzimlerin ve birçok hücrel yapının temel bileşeni olan azot (N), mikroorganizmaların büyüme ve gelişmesi için besin yerlerinde muhakkak olması gereken elementtir (Gottschalk, 2012). Daha önceki çalışmalarda L-asparaginaz aktivitesinin artırılmasında kullanılan organik ve inorganik azot kaynaklarından yeast ve amonyum nitrat dışındaki azot kaynaklarının enzim aktivitesini artırmadığı tespit edilmiştir (Sarquis *et al.* 2004; Hymavathi *et al.* 2010; Ebrahiminezhad *et al.* 2011). Çalışma sonuçlarımız literatür çalışmalarına uygunluk gösterip; azot kaynaklarını optimize etmek üzere; pepton, tavuk tüyü peptonu ve NH_4PO_4 kullanılmıştır. Çalışma sonucunda; L-asparaginaz enzimine ek olarak başka bir azot kaynağı kullanıldığında enzim aktivitesinde düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan optimizasyon sonunda en yüksek aktivite; tavuk tüyü peptonu azot kaynağı olarak kullanıldığında gerçekleşmiştir. Ölçülen

aktivite değerleri; SC4 79.28 U/ml, WC 67.2 U/ml ve E6 81.3 U/ml şeklindedir (Çizelge 4.8). Bakteriler besiyeri ortamında daha çok kullanılabilir formda veya daha çabuk kullanılabilir forma dönüştürülebilir azot kaynaklarını öncelikle kullanma eğilimlidirler (Izobe and Ohte 2014). Bu sebeple ortama L- asparaginden başka azot kaynağı eklendiğinde öncelikle onları bakteriler kullanmış ve L-asparaginaz enzim üretim miktarı düşük olduğundan ölçülen aktivitelere düşük ölçülmüştür.

5.4.4. pH'nın L-asparaginaz üretimine etkisi

Mikroorganizmalar, farklı pH derecelerinde gelişme gösterirler. Literetür çalışmalarında mikroorganizmaların farklı pH'larda (5,8 – 10.0) yüksek L-asparaginaz aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir (Hadaspar *et al.* 2010; Erva *et al.* 2017; Nakkar *et al.* 2018; Hassan *et al.* 2018). 5.0-9.0 arasında değişen dokuz farklı pH. Shukla and Mandal (2013) yaptıkları optimizasyon çalışmasında maksimum enzim aktivitesi PH 7.0'da (7.2 U / ml) gözlemlenmiştir. L-asparaginaz üretimi için benzer pH değerleri *Streptomyces plicatus* (Koshy ve diğerleri 1997), *Amycolatopsis CMU-H002* (Khamna *et al.* 2009) .Besi ortamının pH değerinin enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacıyla; 5, 6, 7, 8 ve 9 pH'lık besi ortamları hazırlanmış ve 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ölçümler yapılmıştır. Üç bakteri için de, en yüksek aktivite pH 7'de ölçülmüştür. Ölçülen değerler; SC4 150.2, WC 165 ve E6 147 şeklindedir (Çizelge 4.9). Çalışma sonuçlarımızda üç izolatomızda aynı pH değerinde yüksek aktivite göstermiştir. Bunun sebebi aynı cinse ait bakteriler olduklarından benzer gelişme şartlarına ihtiyaç duymalarındandır (Şekil 4.6).

5.4.5. Zamanın L-asparaginaz üretimine etkisi

Mikroorganizmalar farklı gelişim evrelerinde, farklı metabolit üretirler ve bu metabolitlerin miktarı da evrelere göre değişiklik gösterir. Log fazında primer metabolit, lag fazında ise sekonder metabolit üretirler (Gottschalk 2012). Daha önceki çalışmalarıda L-asparaginazın en iyi aktiviteye sahip olduğu süreçler 20 saat ve 72 saat arasında değişmektedir (Hadaspar *et al.* 2010; Kamble *et al.* 2012; Erva *et al.* 2017). Shukla and

Mandal (2013) *Bacillus subtilis*'in 48 saatlik fermente edilmiş 90 ml ekstraktta maksimum L-asparaginaz (13,2 U / ml) elde etmişlerdir. Bu çalışmada L-asparaginaz aktivitesi yüksek olan izolatların; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda enzim aktiviteleri ölçülmüştür. En yüksek aktivite 48 saatlik sürenin sonunda ölçülmüştür. Ölçülen değerler; SC4 150, WC 165 ve E6 147 şeklindedir (Çizelge 4.10). Genişletilmiş inkübasyon süresi, bölgedeki diğer bileşenlerle etkileşime bağlı olarak enzimin bozulmasına neden olabilir (Ramesh and Lonsane 1987).

5.5. SDS- PAGE Analiz Sonuçları

Çeşitli mikroorganizmalardan saflaştırılan L-asparaginaz enziminin molekül ağırlıkları birbirinden farklı olabilir. Daha önceki çalışmalarda farklı mikroorganizmalardan elde edilen L-asparaginaz enziminin moleküler ağırlığının 31 kDa ve 140 kDa arasında değiştiğini belirlemişler. Saflaştırma iyi şartlarda ve herhangi bir kirletici unsur olmadığında SDS jelde L-asparaginaz tek bir bant halinde görülmektedir. (Kavitha *et al.* 2010; Kumar and Selvam 2011; Kebeish *et al.* 2017). Saflaştırılan enzimin SDS jeldeki bandı standart protein kiti (Qiagen) ile karşılaştırılıp enzimin yaklaşık molekül ağırlığı belirlenmektedir. Çalışmamızda kullanılan bakterilerin ürettiği L-asparaginaz kısmi olarak saflaştırılıp (WC kodlu bakterinin jel yürütme sonucunda tek bant oluşmamış ancak diğer bakterilere nazaran enzim aktivitesi daha yüksek olduğundan en üstteki bandın L-asparaginaz olduğu düşünülmüştür.) standart protein kitiyle karşılaştırılmıştır. Molekül ağırlıkları sırasıyla; WC; 100 kDa, E6; 35 kDa ve SC4; 75 kDa'dır (Şekil 4.5). Araştırmaya sonuçlarımız izole ettiğimiz *Bacillus* cinsine ait türlerden özellikle ikisinin (*Bacillus atrophaeus* ve *Bacillus pumilus*) yüksek molekül ağırlığına sahip olduğunu göstermektedir.

5.6. Sonuç ve Öneri

Çalışma sonunda elde edilen bulgular gösteriyor ki; çeşitli hayvanların sindirim sisteminde yaşayan mikroorganizmalar L-asparaginaz üretimi bakımından zengin

çeşitliliğe sahiptir. Bu mikroorganizmalar; insan dışkısından izole edilen *Bacillus atrophaeus* WC1, sığır sindirim sisteminden izole edilen *Bacillus subtilis* E6 ve toprak solucanı sindirim sisteminden izole edilen *Bacillus pumilus* SC4'tür. Bu bakteriler biyoteknolojik öneme sahip L-asparaginaz enzimini ürettiği tespit edilmiş ve enzim aktivitelerinin yüksek olduğu bulunmuştur. Önceki çalışmalarda, L-asparaginaz üreten mikroorganizmalar çeşitli ortamlardan (toprak, farklı su örnekleri, rizosfer örnekleri vb.) izole edilmiştir. Yaptığımız çalışma mikroorganizmaların, özel olarak çeşitli hayvan gruplarının sindirim sisteminden izole edilmesi bakımından ilk olup büyük önem taşımaktadır.

Çalışma sonucunda izole ettiğimiz WC (*Bacillus atrophaeus*), E6 (*Bacillus subtilis*) ve SC4 (*Bacillus pumilus*) için L-asparaginaz aktivite optimizasyon çalışmaları yapılmış ve en iyi karbon kaynağının glikoz olduğu (2g/L), optimum pH'nın 7, optimum sıcaklığın 30°C olduğu bulunmuştur. Ayrıca L- asparagine ek azot kaynağının aktiviteyi artırmadığını aksine aktiviteyi düşürdüğü bulunmuştur. *Bacillus atrophaeus* (WC), *Bacillus subtilis* (E6) ve *Bacillus pumilus* (SC4) bakterilerinin ürettiği L-asparaginaz enzimi kısmı olarak saflaştırılıp SDS PAGE analizi yapılmış ve bu bakterilere ait L-asparaginaz enziminin yaklaşık molekül ağırlıkları sırasıyla; 100 kDa, 35 kDa ve 75 kDa olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan, bakterilerin dışında izole ettiğimiz diğer bakterilerin enzim üretim ve aktiviteleri değerlendirilebilir ölçüdedir. Çalışmada kullanılmayan diğer bakteriler, L-asparaginaz üretimi ve optimizasyonu için değerlendirilebilir. Bakterilerin enzim verimliliğini artırmak için farklı besin kaynakları kullanılabilir. Üretilen L-asparaginazın kanser tedavisine etki oranı araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- A. Koshy, K. Dhevendaran, M.I Georgekutty and P. Natarajan (1997). L-asparaginase in *Streptomyces plicatus* isolated from the alimentary canal of the fish, *Gerres filamentosus*(Cuvier). *Journal of Mar Biotechnology*: Vol. (5)181-185.
- Abdel-Fattah, Y. R. And Olama, Z. A. (2002). L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. *Process Biochemistry*, 38 (1), 115-122.
- Akgün, B. ve Arıcı, M. (2018). Akrilamid; Toksisitesi, Azaltma Teknikleri ve Analiz Yöntemleri. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (20), 12-21.
- Ali, U. Naveed, M. Ullah, A. Ali, K. Shah, S. A, Fahad, S. and Mumtaz, A. S. (2016). L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to targ *et al. L. European journal of pharmacology*, 771, 199-210.
- Asrore SMM, Sieo CC, Chong CW, *et al.* Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathog* 2015;7:4.
- Basha, N. S. Rekha, R. Komala, M, and Ruby, S. (2009). Production of extracellular anti-leukaemic enzyme lasparaginase from marine actinomycetes by solidstate and submerged fermentation: Purification and characterisation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (4).
- Baskar, G. and Renganathan, S. (2009). Production of L-asparaginase from natural substrates by *Aspergillus terreus* MTCC 1782: Effect of substrate, supplementary nitrogen source and L-asparagine. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 7 (1).
- Batool, T. Makky, E. A. Jalal, M, and Yusoff, M. M. (2016). A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178 (5), 900-923.
- Berasategui, A. Shukla, S. Salem, H. and Kaltenpoth, M. (2016). Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 100 (4), 1567-1577.
- Borek D, Jaskolski M (2001) Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochim Polon* 48: 893– 902.
- Broome, J. D. (1961). Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature*, 191(4793), 1114.
- Cachumba, J. J. M. Antunes, F. A. F. Peres, G. F. D. Brumano, L. P. Dos Santos, J. C. and Da Silva, S. S. (2016). Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *brazilian journal of microbiology*, 47, 77-85.
- Campbell, H. A. Mashburn, L. T. Boyse, E. A. and Old, L. J. (1967). Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B. Their separation, purification, and antitumor activity. *Biochemistry*, 6 (3), 721-730.
- Cedar, H. and Schwartz, J. H. (1968). Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 96(6), 2043-2048.

- Cetin, E. Temelli, S. and Eyigor, A (2015). Salmonella prevalence and serovar distribution in healthy slaughter sheep and cattle determined by ISO 6579 and VIDAS UP Salmonella methods. *Journal of Food Science and Technology*, 1-9.
- De -Angeli, L. C. Pocchiari, F. Russi, S. Tonolo, A. Zurita, V. E. Ciaranfi, E. and Perin, A. (1970). Effect of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* on ascites sarcoma in the rat. *Nature*, 225(5232), 549.
- Dejong PJ (1972) L-Asparaginase production by *Streptomyces griseus*. *Appl Environ Microbiol* 23:1163–1164
- Dhanam Jayam, G., Kannan, S., 2014. Screening and characterization of L-asparaginase producing *Streptomyces* isolated from soil samples of Periyar Lake, Kumily. *Bioscience Discovery*, 5: 50-54.
- Dharmaraj, S. (2011). Study of L-asparaginase production by *Streptomyces noursei* MTCC 10469, isolated from marine sponge *Callyspongia diffusa*. *Iranian journal of biotechnology*, 9 (2), 102-108.
- Doriya, K. Jose, N. Gowda, M. and Kumar, D. S. (2016). Solid-state fermentation vs submerged fermentation for the production of L-asparaginase. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 78, pp. 115-135). Academic Press.
- Ebrahiminezhad, A. Rasoul - Amini S. Ghoshoon, M. B. and Ghasemi, Y. (2014). *Chlorella vulgaris*, a novel microalgal source for L-asparaginase production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 214-217.
- Egler, R. A. Ahuja, S. P, and Matloub, Y. (2016). L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 7(2), 62.
- El-Naggar, N. E. A. Deraz, S. F, El-Ewasy, S. M. and Suddek, G. M. (2018). Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from *Streptomyces brollosae* NEAE-115. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 19 (1), 51.
- Erva, R. R. Goswami, A. N. Suman, P, Vedanabhatla, R. and Rajulapati, S. B. (2017). Optimization of L-asparaginase production from novel *Enterobacter* sp, by submerged fermentation using response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47 (3), 219-228.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Gholamian, S. Gholamian, S. Nazemi, A, and Nargesi, M. M. (2013). Optimization of culture media for L-asparaginase production by newly isolated bacteria, *Bacillus* sp. GH5. *Microbiology*, 82 (6), 856-863.
- Ghosh, S. Murthy, S. Govindasamy, S. and Chandrasekaran, M. (2013). Optimization of L-asparaginase production by *Serratia marcescens* (NCIM 2919) under solid state fermentation using coconut oil cake. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 9.
- Ghoshoon, M. B., Raei, M. J., 2008. An optimized medium for screening of Lasparaginase production by *Escherichia coli*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(4): 422-424.
- Goodsell, D. S. (2005). The molecular perspective: L-asparaginase. *The oncologist*, 10(3), 238-239.
- Gummadi, C. (2014). Screening and isolation of novel glutaminase free L-asparaginase from fungal endophytes. *Research Journal of Microbiology*, 9(4), 163-176.

- Gupta, N., Sahoo, D., Basak, U. C., 2009. Screening of *Streptomyces* for L-asparaginase Production. *Academic Journal of Cancer Research*, 2(2): 92-93.
- Haley, E. E. Fisher, G. A. And Welsh, A. D. (1961). 'The requirement for L-asparagine of mouse leukemia cells L5178Y in culture.' *Cancer Res.* 21, 532.
- Hosamani, R. and Kaliwal, B. B. (2011). L-asparaginase an anti-tumor agent production by *Fusarium equiseti* using solid state fermentation. *International Journal of Drug Discovery*, 3(2), 88-99.
- Hymavathi, M. Sathish, T, Rao, C. S, and Prakasham, R. S. (2009). Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. *Applied biochemistry and biotechnology*, 159(1), 191-198.
- Isobe, K. and Ohte, N. (2014). Ecological perspectives on microbes involved in N-cycling. *Microbes and environments*, ME13159.
- Jha, S. K., Pasrija, D., Sinha, R. K., Singh, H. R., Nigam, V. K., Vidyarthi, A. S., 2012. Microbial L-asparaginase: a review on current scenario and future prospects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(9): 3076.
- Kafkewitz D, Goodman D (1974) L-Asparaginase production by the rumen anaerobe *Vibrio succinogenes*. *Appl Environ Microbiol* 27:206–209
- Kamble, K. D., Bidwe, P. R., Muley, V. Y., Kamble, L. H., Bhadange, D. G., Musaddiq, M., 2012. Characterization of L-asparaginase producing bacteria from water, farm and saline soil. *Bioscience Discovery*, 3(1): 116-119.
- Kamble, V. P. Rao, R. S. and Borkar, P. S. (2006). Purification of L-asparaginase from a bacteria *Erwinia carotovora* and effect of a dihydropyrimidine derivative on some of its kinetic parameters.
- Khamna, S. Yokota, A. and Lumyong, S. (2009). L-asparaginase production by actinomycetes isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *International Journal of Integrative Biology*, 6(1), 22-26.
- Kidd J (1953) Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum or rabbit serum. *J Exp Med* 98:565–582.
- Koeller KM, Wong CH. Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 2001;409:232–40.
- Krishnapura, P. R. Belur, P. D. and Subramanya, S. (2016). A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases. *Critical reviews in microbiology*, 42(5), 720-737.
- Kukurová, K. Morales, F. J. Bednáriková, A, and Ciesarová, Z. (2009). Effect of l-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model. *Molecular nutrition and food research*, 53(12), 1532-1539.
- Kumar, N. M. Ramasamy, R. and Manonmani, H. K. (2013). Production and optimization of l-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Industrial crops and products*, 43, 150-158.
- Lazupone, CA. Stombaugh, J. Gonzales, A. Ackermann G. Wendel, D, Baeza, YV. Janson, JK. Gordon JI, Knight R. (2013). Meta-analyses of studies of the human microbiota. *Genome Res.* 2013 Oct; 23(10): 1704–1714.

- M.V Ramesh and B.K Lonsane (1987). A novel bacterial thermo stable alpha amylase system produced under solid- state fermentation. *Biotechnology Letters*: Vol.(9) 501-504.
- Mahajan, R. V. Kumar, V. Rajendran, V. Saran, S. Ghosh, P. C, and Saxena, R. K. (2014). Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from *Bacillus licheniformis*: in vitro evaluation of anti-cancerous properties. *PLoS One*, 9(6), e99037.
- Makky, E. A., Ong, J. J., Karim, M. R., Lee, C. M., 2013. Production and optimization of L-asparaginase by *Bacillus* sp. KK2S4 from corn cob. *African Journal of Biotechnology*, 12(19).
- Mao, S. Zhang, M. Liu, J, & Zhu, W. (2015). Characterizing the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: Membership and potential function. *Scientific Reports*, 5, 16116. <https://doi.org/10.1038/srep16116>.
- Mashburn LT, Wriston JC (1964). Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 105: 450-452.
- Mateo, C. Palomo, J. M, Fernandez-Lorente, G. Guisan, J. M, and Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and microbial technology*, 40(6), 1451-1463.
- Maysa, E. M. Amira, M, Gamal, E. Sanaa, T. and Sayed, E. I. (2010). Production, immobilization and anti-tumor activity of L-asparaginase of *Bacillus* sp R36. *Journal of American Science*, 6(8), 157-165.
- Mishra, A. (2006). Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 135(1), 33-42.
- Moorthy, V. Ramalingam, A. Sumantha, A. and Shankaranaya, R. T. (2010). Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp. *Afr J Microbiol Res*, 4(18), 1862-1867.
- Mukherjee, J. Majumdar, S. and Scheper, T. (2000). Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(2), 180-184.
- Müller, H. J. and Boos, J. (1998). Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Critical reviews in oncology/hematology*, 28(2), 97-113.
- Narayana, K. J. P.Kumar, K. G. and Vijayalakshmi, M. (2008). L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), 331-336.
- Narta, U. K. Kanwar, S. S. and Azmi, W. (2007). Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical reviews in*
- Nazemi, A. and Miri Nargesi, M. (2013). Isolation and molecular identification of *Bacillus* species that produce extracellular L asparaginase, an anti-cancer enzyme, from soils. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 3(11), 9-13. *oncology/hematology*, 61(3), 208-221.
- Oettgen HF, Old LJ, Boyse EA, Campbell HA, Bayard D, Clarkson BD, Tallal L, Leeper RD, Schwartz MK (1967). Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Res* 27: 2619-2631.

- Orhan, H. (2018). *Kanser tedavisinde kullanılan L-asparaginase used for cancer treatment to magnetic nanoparticles* (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Ozdal, M. Ozdal, O. G. and Algur, O. F. (2016). Isolation and characterization of α -endosulfan degrading bacteria from the microflora of cockroaches. *Polish journal of microbiology*, 65(1), 63-68.
- Özdal, Ö. G. Özdal, M, Algur, Ö. F. and Sezen, A. (2016). Isolation and identification of α -Endosulfan degrading bacteria from insect microflora. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 4(4),
- Patro, K. R. and Gupta, N. (2012). Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. *International Journal*
- Peterson, R. E. and Ciegler, A. (1969). L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 18(1), 64-67.
- Prakasham, R. Rao, C. S, Rao, R. S. Lakshmi, G. S. & Sarma, P. (2007). L- asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp.–6A: Design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1382–1391.
- Pritsa, A. A. and Kyriakidis, D. A. (2001). L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: Purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity. *Molecular and cellular Biochemistry*, 216(1-2), 93-101.
- Romero, J. Ringø, E. and Merrifield, D. L. (2014). The gut microbiota of fish. *Aquaculture nutrition: Gut health, probiotics and prebiotics*, 75-100.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sarquis, M. I. D. M. Oliveira, E. M. M. Santos, A. S. and Costa, G. L. D. (2004). Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5), 489-492. 1994.
- Scheetz, R. W. Whelan, H. A, and Wriston, J. C. (1971). Purification and properties of an L-asparaginase from *Fusarium tricinctum*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 142(1), 184-189.
- Shrivastava, A, Khan, A. A, Khurshid, M. Kalam, M. A. Jain, S. K. and Singhal, P. K. (2016). Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Critical reviews in oncology/hematology*, 100, 1-10.
- Shukla, S., and Mandal, S. K. (2013). Production Optimization of Extracellular L-asparaginase Through Solid-State Fermentation by Isolated *Bacillus subtilis*. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol*, 4(1), 219-226.
- Sinha, R. A. T. I, Singh, H. R. & Jha, S. K. (2013). Microbial L-Asparaginase: present and future prospective. *International Journal of Innovative Research in Science*, 2(2007), 2319-8753.
- Sudhir, A. P. Dave, B. R, Trivedi, K. A, and Subramanian, R. B. (2012). Production and amplification of an l-asparaginase gene from actinomycete isolate *Streptomyces* ABR2. *Annals of Microbiology*, 62(4), 1609-1614.
- Tamura K. Nei M. and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A. and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tosa T, Sano R, Yamamoto K, Nakamura M, Ando K, Chibata I (1971) L-Asparaginase from *Proteus vulgaris*. *Appl Environ Microbiol* 22:387–392
- Ulu, A. Noma, S. A. A, Koytepe, S. & Ates, B. (2019). Chloro-Modified Magnetic Fe₃O₄@ MCM-41 Core–Shell Nanoparticles for L-Asparaginase Immobilization with Improved Catalytic Activity, Reusability, and Storage Stability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(3), 938-956.
- Usha, R., Mala, K. K., Venil, C. K., Palaniswamy, M., 2011. Screening of Actinomycetes from mangrove ecosystem for L-asparaginase activity and optimization by response surface methodology. *Polish Journal of Microbiol*, 60(3): 213-221.
- Van den Berg, H. (2011). Asparaginase revisited. *Leukemia and lymphoma*, 52(2), 168-178.
- Venil, C. K. Nanthakumar, K. Karthikeyan, K. and Lakshmanaperumalsamy, P. (2009). Production of l-asparaginase by *Serratia marcescens* SB08: optimization by response surface methodology. *Iranian Journal of Biotechnology*, 7(1), 10-18.
- Verma, N. Kumar, K. Kaur, G. and Anand, S. (2007). L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1), 45-62.
- Vijayakumar, G. Dharmendirakumar, M. Renganathan, S. Sivanesan, S., Baskar, G., and Elango, K. P. (2009). Removal of Congo red from aqueous solutions by perlite. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 37, 355-364. Wong C-H, Whitesides GM. *Enzymes in synthetic organic chemistry*. Oxford:Pergamon Press;
- Zhang, Y. Zhang, F. Shakhsher, Y. Silver, J. D. Klinefelter, A. Nagaraju, M, and Wood A. (2012). A batteryless 19µW MICS/ISM-Band energy harvesting body sensor node SoC for ExG applications. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 48(1), 199-213.
- Zuo, S, Zhang, T. Jiang, B. and Mu, W. (2015). Recent research progress on microbial L-asparaginase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (3), 1069-1079.
- Zyzak, D. V, Sanders, R. A. Stojanovic, M, Tallmadge, D. H. Eberhart, B. L. Ewald, D. K, ... and Villagran, M. D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4782-4787.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Erzurum’da doğdu. İlkokulu Yoncalık Köyü İlkokulu’nda (2000), ortaokulu Celal Akın İlköğretim Okulu’nda (2003) ve liseyi Nenehatun Kız Lisesi’nde (2006) tamamladı. 2008 yılında öğrenime başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2012 yılında mezun oldu. 2010-2012 yılları arasında Pedagojik formasyon eğitimi aldı. 2014 yılında Milli Eğitim Bakanlığında Biyoloji Öğretmeni olarak Erzurum’da başladığı görevine, Bartın’da devam etmektedir. 2015 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans öğrenimine başladı.