

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

KİTİNOLİTİL *Bacillus* SUŞLARI KULLANILARAK

KİTOOLİGOSAKKARİTLERİN

ENZİMATİK ÜRETİMİ

Fakhra LIAQAT

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Rengin ELTEM

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 03.05.2018

Bornova-İZMİR

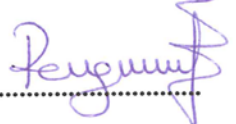
2018

Fakhra LIAQAT tarafından doktora tezi olarak sunulan “**Kitinolitik *Bacillus* Suşları Kullanılarak Kitoooligosakkaritlerin Enzimatik Üretimi**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 03.05.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

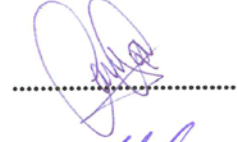
Jüri Başkanı : Prof. Dr. Rengin ELTEM

.....


Raportör Üye : Doç. Dr. Sayit SARGIN

.....

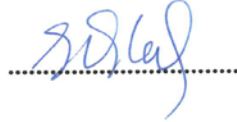

Üye : Dr. Öğr. Üyesi. İsmail Hakkı AKGÜN

.....


Üye : Dr. Öğr. Üyesi. Ali Oğuz BÜYÜKKİLECI

.....


Üye : Doç. Dr. Evrim ÖZKALE

.....


EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Kitinolitik *Bacillus* Suşları Kullanılarak Kitoooligosakkaritlerin Enzimatik Üretimi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

03 / 05 / 2018

Fakhra

Fakhra LIAQAT

ÖZET

KİTİNOLİTİK *Bacillus* SUŞLARI KULLANILARAK
KİTOOLİGOSAKKARİTLERİN ENZİMATİK ÜRETİMİ

LIAQAT, Fakhra

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Rengin ELTEM

Mayıs 2018, 164 sayfa

Kitin ve kitosanın enzimatik veya kimyasal depolimerizasyonu ile kitooligosakkaritler (COS) elde edilmektedir. Suda çözünen ve düşük molekül ağırlıklı kitooligosakkarit türevleri, birçok açıdan ana polimerden üstündür. COS'ler çok geniş alanda biyolojik aktiviteye ve çeşitli endüstrilerde dikkat çekici potansiyel uygulama alanına sahiptir. Bu proje daha önce izole edilen ve moleküler olarak tanımlanmış yerli *Bacillus* suşları tarafından üretilen farklı kitosanaz enzimleri kullanılarak kitosanın enzimatik hidrolizi ile COS üretmek amacı ile planlanmıştır. Bu amaçla, maksimum kitinaz ve kitosanaz aktivitelerinin belirlenmesi için 16 farklı kitinolitik *Bacillus* suşu taranmıştır. İstatistiksel yöntemler kullanılarak kitosanaz üretiminin optimizasyonu için *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i (GenBank aksesyon numara KC119405) seçilmiştir. 7,5 g L⁻¹ çözünür nişasta, 6,5 g L⁻¹ kolloidal kitosan, 7,5 g L⁻¹ pepton ve 3,5 g L⁻¹ NaCl içeren bir ortam keşfedilmiş ve optimize edilmiş ortam kullanılarak kitosanaz aktivitesi 9,5 kata kadar artmıştır.

Daha sonra 37 kDa'lık bir kitosanaz iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış kitosanazın optimum sıcaklığı ve pH'sı sırasıyla 55°C ve 5,5 olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin %66'sının bir saat boyunca 55°C'de stabil olarak kaldığı ayrıca geniş bir pH (3,0-11,00) aralığında stabil olduğu saptanmıştır. Kitosanaz için optimum substrat çözünür kitosan olmuş ve çözünür kitosan ile enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,1 mg mL⁻¹ ve 244,5 µmol min⁻¹ mg⁻¹ olarak belirlenmiştir.

Ayrıca, COS analizi için HPLC yöntemini optimize etmek için farklı kolonlar ve detektörler test edilmiştir. Daha sonra DAD detektörü ve Hypersil APS-2 kolonu kullanılarak bir gradiyent elüsyon yöntemi optimize edilmiştir. *Bacillus* suşlarının ham kitosanaz ekstraktları, kitosanı COS'lere hidrolize etmek için kullanılmış ve hidrolizatlar, optimize edilmiş yöntem kullanılarak HPLC ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. 14 *Bacillus* suşunun ham kitosanaz ekstraktları, kitosanı COS'lere başarılı bir şekilde hidrolize edebilmiş ve polimerizasyon derecesi (DP) 2-6 arasında olan farklı oligomerler tespit edilmiştir. COS ürünlerinin relatif verimleri %11-31 aralığında belirlenmiş ve *Bacillus thuringiensis* EGE-B-3.5m suşunun ham kitosanaz ekstraktı ile en yüksek relatif verim (%31) elde edilmiştir. Ham kitosanaz ekstraktlarının çoğukitosanın hidroliz ürünü olarak kitobiyoza oluşturmuştur. HPLC metodu, COS karışımının etkili bir şekilde ayrılmasını sağlayabilmesine rağmen, sonuçların doğrulanması ve oligomerlerin doğru karakterizasyonu için LC-MS, MALDI-TOF-MS ve NMR analizinin yapılması gerekli olmuştur.

Anahtar sözcükler: Kitin, kitosan, kitooligosakkarit, kitosanaz, *Bacillus*, HPLC

ABSTRACT

**ENZYMATIC SYNTHESIS OF CHITOLIGOSACCHARIDES
BY USING CHITINOLYTIC *Bacillus* STRAINS**

LIAQAT, Fakhra

PhD Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Rengin ELTEM

May 2018, 164 pages

The enzymatic or chemical depolymerisation of chitin and chitosan delivers chitooligosaccharides (COS). Water soluble, low molecular weight and biologically active COS derivatives are superior to the parent polymers in multiple aspects. This project was designed to produce COS by enzymatic hydrolysis of chitosan using crude chitosanase extracts of previously isolated and identified indigenous chitinolytic *Bacillus* strains. For this purpose, 16 different chitinolytic *Bacillus* strains were tested for their chitinase and chitosanase activities. *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i (GenBank accession number KC119405) was selected for chitosanase production optimization using statistical methods. A medium containing 7.5 g L⁻¹ soluble starch, 6.5 g L⁻¹ colloidal chitosan, 7.5 g L⁻¹ peptone and 3.5 g L⁻¹ NaCl was discovered and chitosanase activity was enhance up to 9.5 folds using the optimized medium.

A chitosanase of 37 kDa was then purified by using ion exchange chromatography. The optimum temperature and pH of purified chitosanase were 55°C and 5.5, respectively. The enzyme was stable at 55°C for 1 h with 66% of its activity and also stable in a wide range of pH (3.0-11.0). The optimum substrate for the chitosanase was soluble chitosan and the K_m and V_{max} values of enzyme with soluble chitosan were 2.1 mg mL⁻¹ and 244.5 μmol min⁻¹ mg⁻¹, respectively.

Furthermore, different columns and detectors were tested to optimize the HPLC method for COS analysis. A gradient elution method was then optimized using DAD detector and Hypersil APS-2 column. The crude chitosanase extracts of *Bacillus* strains were used to hydrolyse chitosan into COS and the hydrolysates

were quantitatively analysed by HPLC using optimized method. Chitosanases of 14 *Bacillus* strains were able to successfully hydrolyse chitosan to COS and different oligomer from DP 2-6 were detected. Relative yields of the COS products were in a range of 11-31% and chitosanase of *Bacillus thuringiensis* EGE-B-3.5m has presented maximum relative yield (31%). For most of the chitosanases the major chitosan hydrolysis product was chitobiose. Although the HPLC method was capable to provide efficient separation of COS mixture but for the validation of results and proper characterization of oligomers LC-MS, MALDI-TOF-MS and NMR analysis of the products is necessary.

Keywords: Chitin, chitosan, chitooligosaccharides, chitosanase, *Bacillus*, HPLC

TEŞEKKÜR

İlk olarak ve en önemlisi, çalışmalarım süresince bana her türlü desteği veren, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, gerek akademik yaşantım gerekse hayata dair en değerli bilgileriyle yolumu aydınlatan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Rengin Eltem'e üzerimdeki emeği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Pozitif enerjisiyle desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli bilgileriyle çalışmama yol gösteren ve çalışmamın en zorlu aşamasında laboratuvarının kapılarını bana açan Tez İzleme Komitesi üyeleri Yar. Doç. Dr. İsmail Hakkı Akgün ile Doç. Dr. Sayıt Sargın'a çok teşekkür ederim.

EÜ Biyomühendislik Bölümü'nü bizlere yuva olarak tanımlayan ve büyük bir aile olduğumuzu hep hatırlatan, tez çalışmam süresince bölümümüz laboratuvarlarının alt yapı imkanlarından yararlanmama izin veren değerli hocam Bölüm Başkanı Prof. Dr. Nuri Azbar'a teşekkür ederim. Ayrıca sevgili hocalarım, Prof. Dr. Murat Elibol, Prof. Dr. Aynur Gürel, Prof. Dr. Esin Hameş, Prof. Dr. Meltem Conk Dalay, Prof. Dr. Gaye Öngen, Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz ve Prof. Dr. M. Bahattin Tanyolaç'a bilgi ve tecrübelerini paylaştıkları ve her ihtiyaç duyduğumda içtenlikle çözümler ürettikleri için teşekkür ederim.

Doktora çalışmam süresince hep desteklerini gördüğüm sevgili Arş. Gör. Dr. Pınar Sözer Bahadır, Dr. Zeliha Demirel ve Arş. Gör. Dr. Tuğba Keskin Gündoğdu'ya teşekkür ederim.

Biyomühendislik Bölümü, Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarında çalışan, başta doktora öğrencisi Derya Maral olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma hep destek oldukları için teşekkür ederim. Doktoram boyunca hep yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen tüm hocalarıma, arkadaşlarıma, sevgi ve teşekkürü borç bilirim.

Doktora eğitimim için hak kazandığım "Ali Kuşçu Bilim ve Teknoloji Burs Programı" ile beni destekleyen TÜRKİYE BURSLARI'na teşekkürlerimi sunarım.

15-FBE-11 ve 16-MÜH-112 nolu Bilimsel Araştırma Projeleri ile tezime mali destek veren EÜ Rektörlüğü BAP Komisyonu'na teşekkür ederim.

Beni hayatım boyunca hep anlayış ve sabırla destekleyen sevgili aileme; babam Liaqat Ali, annem Rubeena Liaqat'a en içten teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxviii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1 Kitin	3
2.2 Kitosan	4
2.3 Kitooligosakkaritler	5
2.4 Kitooligosakkaritlerin Özellikleri	6
2.5 Kitooligosakkaritlerin Sentezi	8
2.5.1 Fiziksel yöntemlerle kitooligosakkarit sentezi	8
2.5.2 Kimyasal yöntemlerle kitooligosakkarit sentezi	9
2.5.3 Enzimatik yöntemlerle kitooligosakkarit sentezi.....	10

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.6 Kitinolitik Enzimler	11
2.7 Kitoooligosakkaritlerin Karakterizasyonu	15
2.8 Kitoooligosakkaritlerin Biyolojik Uygulamaları	18
2.8.1 Antimikrobiyal aktivite	18
2.8.2 Antioksidan aktivite	21
2.8.3 Antienflamatuvar aktivite	22
2.8.4 Anti-tümör / anti-kanser aktivitesi	23
2.8.5 İmmunostimülatör aktiviteler	24
2.8.6 Yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu özellikleri	25
2.8.7 Hipokolesterolemik etki	26
2.8.8 Bitki Elisitörleri	26
2.8.9 Gıda katkı maddeleri olarak kitoooligosakkaritler	27
2.9 Ticari Kitoooligosakkarit Ürünleri	28
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1 Materyal	31
3.1.1 Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	31
3.1.2 Kullanılan besin ortamları, çözeltiler ve kimyasallar	31

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.3 Kullanılan cihazlar.....	38
3.2 Metot.....	40
3.2.1 <i>Bacillus</i> suşlarına ait kültürlerin aktifleştirilmesi	40
3.2.2 <i>Bacillus</i> suşlarının kitinaz aktivitelerinin taranması	40
3.2.3 <i>Bacillus</i> suşlarının kitosanaz aktivitelerinin taranması	41
3.2.4 Kitosanaz üretiminin optimizasyonu	44
3.2.5 Kitosanaz saflaştırması	45
3.2.6 Kitosanaz enziminin kısmi karakterizasyonu	48
3.2.7 Enzimatik olarak kitooligosakkaritlerin üretimi.....	50
3.2.8 İstatistiksel analizler	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	55
4.1. <i>Bacillus</i> Suşlarının Kitinolitik Aktiviteleri.....	55
4.2 Kitosanaz Üretiminin Optimizasyonu	76
4.2.1 Optimum karbon ve azot kaynağının belirlenmesi.....	77
4.2.2 Plackett Burman (PB) tasarımıyla önemli değişkenlerin seçimi	80
4.2.3 Merkezi Kompozit Tasarımı (CCD) ile değişkenlerin seviye optimizasyonu	83
4.2.4 Optimizasyon modelinin doğrulanması	90

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3 Kitosanazın Saflaştırılması	93
4.4 Kitosanaz Enziminin Kısmi Karakterizasyonu	96
4.4.1 Enzimin Optimum sıcaklığının ve termal stabilitesinin belirlenmesi.....	96
4.4.2 Enzimin optimum pH ve pH stabilitesi.....	98
4.4.3 Enzimin substrat özgüllüğü.....	100
4.4.4 Kinetik çalışmalar	102
4.4.5 Enzim aktivitesine metal iyonlarının ve kimyasalların etkileri	103
4.5 Kitosan'dan Enzimatik Olarak Kitooligosakkaritlerin Üretimi	105
4.5.1 Kitooligosakkaritlerin kantitatif analizi için HPLC yönteminin optimizasyonu	106
4.5.2 Optimize edilmiş HPLC yöntemiyle standartlara ait kalibrasyon eğrisinin çıkartılması	111
4.5.3 Enzimatik olarak kitooligosakkaritlerin üretimi	111
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	129
KAYNAKLAR DİZİNİ	132
ÖZGEÇMİŞ	162
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 N-asetillenmiş kitooligosakkaritin yapısı (A), N-deasetillenmiş kitooligosakkarit (B), ve kısmen N-deasetillenmiş kitooligosakkarit (C), $m = \text{polimerizasyon derecesi (DP)} = 2-20$, $n = \text{DP} = 2-20$ and $m+n = \text{DP} = 2-20$	8
2.2 Kitooligosakkaritlerin enzimatik ve kimyasal sentezi	11
2.3 Yarıлма spesifiklerinin şematik gösterimi (A) ve kitinazların, kitosanazların ve yeni önerilen enzim sınıfı kitinoanazın (B) hidrolizi ürünleri	13
2.4 İlgili enzim kaynakları ile ilgili bölünme özgünlüğüne göre kitosanaz sınıflandırması. A birimleri beyaz, D birimleri mavi ile temsil edilir. Bir A birimi veya bir D birimi bulunabilen bir konum için daire yarı-beyaz ve yarı-mavi renktedir. Ayrılma noktası siyah bir ters üçgen ile gösterilir	14
2.5 Kitooligosakkaritlerin anti-tümör aktivitelerinden sorumlu potansiyel faktörler	23
3.1 Kitinaz enzim aktivitesi için standart eğri grafiği	41
3.2 Kitosanaz enzim aktivitesi için standart eğri grafiği	43
3.3 Protein miktarı standart eğri grafiği	43
3.4 Gradyent elüsyonu yöntemi	53
4.1 <i>Bacillus cereus</i> EGE-B-5.5m (a) ve <i>Bacillus mojavensis</i> EGE-B-5.2i (b) suşların kolloidal kitin içeren besiyerinde şeffaf hidroliz zonları. <i>Bacillus mojavensis</i> EGE-B-5.2i (c) and <i>B. thuringiensis</i> EGE-B-14.1i (d) suşların kolloidal kitosan içeren besiyerinde şeffaf hidroliz zonları.	56

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.2 Schales metodu ile kitinaz aktivitesi ölçümü (A), DNS metodu ile kitosanaz aktivitesi ölçümü (B)	57
4.3 Farklı günlerde <i>Bacillus cereus</i> EGE-B-6.1m suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B)	58
4.4 Farklı günlerde <i>Bacillus thuringiensis</i> EGE-B-14.1i suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B)	59
4.5 Farklı günlerde <i>Bacillus thuringiensis</i> EGE-B-14.7i suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B)	60
4.6 Farklı günlerde <i>Bacillus mycoides</i> EGE-B-19.3 suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B)	61
4.7 Farklı günlerde <i>Bacillus thuringiensis</i> EGE-B-28.2 suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B)	62
4.8 Farklı günlerde <i>Bacillus cereus</i> EGE-B-2.5m suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B)	63
4.9 Farklı günlerde <i>Bacillus mycoides</i> EGE-B-44.1 suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B)	64

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.10 Farklı günlerde *Bacillus cereus* EGE-B-5.5m suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B)65
- 4.11 Farklı günlerde *Bacillus mycoides* EGE-B-36.1 suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).....66
- 4.12 Farklı günlerde *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B)67
- 4.13 Farklı günlerde *Bacillus cereus* EGE-B-10.4i suşun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).....68
- 4.14 Farklı günlerde *Bacillus thuringiensis* EGE-B-3.5m suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).....69
- 4.15 Farklı günlerde *Bacillus cereus* EGE-B-4.1i suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B)70
- 4.16 Farklı günlerde *Bacillus cereus* EGE-B-4.2i suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B)71
- 4.17 Farklı günlerde *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B)72

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.18 Farklı günlerde *Bacillus subtilis* EGE-B-1.19 suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B) 73
- 4.19 Çeşitli karbon kaynakları ve kombinasyonları ile büyütülen *B. mojavensis* EGE-B-5.2i'nin kitosanaz aktivitesi. 1- toz kitosan, 2- çözünür kitosan, 3- koloidal kitosan, 4- koloidal kitosan+glikoz, 5- koloidal kitosan+laktoz, 6- koloidal kitosan+melas, 7- koloidal kitosan+selüloz, 8- koloidal kitosan+çözünür nişasta 78
- 4.20 Çeşitli azot kaynakları ile büyütülen *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i'nin kitosanaz aktivitesi (U mL⁻¹) 80
- 4.21 Bağımsız değişkenlerin kitosanaz aktivitesine etkilerini gösteren pareto grafiği 82
- 4.22 Koloidal kitosan ve çözünür nişastanın kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği. Pepton (X_3) ve NaCl (X_4) konsantrasyonları sırasıyla 7,5 ve 3,5 g L⁻¹ dir 87
- 4.23 Pepton ve çözünür nişastanın kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği. Koloidal kitosan (X_2) ve NaCl (X_4) konsantrasyonları sırasıyla 6,5 ve 3,5 g L⁻¹ dir 87
- 4.24 NaCl ve çözünür nişastanın kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği. Koloidal kitosan (X_2) ve pepton (X_3) konsantrasyonları sırasıyla 6,5 ve 7,5 g L⁻¹ dir 88
- 4.25 Pepton ve koloidal kitosanın kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği. Çözünür nişasta (X_1) ve NaCl (X_4) konsantrasyonları sırasıyla 7,5 ve 3,5 g L⁻¹ dir 88

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.26 NaCl ve koloidal kitosanın kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği. Çözünür nişasta (X_1) ve pepton (X_3) konsantrasyonları sırasıyla 7,5 ve 7,5 g L⁻¹ dir89
- 4.27 NaCl ve peptonun kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği. Çözünür nişasta (X_1) ve koloidal kitosan (X_2) konsantrasyonları sırasıyla 7,5 ve 6,5 g L⁻¹ dir89
- 4.28 Optimize edilmemiş fermantasyon ortamda (▲) ve optimize edilmiş ortamda (●) kitosanaz aktivitesi (U mL⁻¹) (A), kültür süpernatantındaki protein konsantrasyonu (mg mL⁻¹) (B) ve biyokütle (canlı hücre sayısı) miktarı (cfu mL⁻¹) (C)91
- 4.29 Saflaştırılmış kitosanazın SDS-PAGE analizi. Şeritler: A, moleküler belirteçler; B, kültür süpernatantı; C, amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz sonrasında elde edilen protein fraksiyonları; D, iyon değiştirme kromatografisinden elde edilen aktif fraksiyonlarda bulunan saflaştırılmış kitosanaz94
- 4.30 Farklı sıcaklıkların *B. mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz aktivitesi üzerindeki pH 5,5'te belirlenen etkileri96
- 4.31 Farklı sıcaklıklarda, 20 mM asetat tamponu (pH 5,5) içinde 1 saat inkübe ederek incelenmiş *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz enziminin termal stabilitesi98
- 4.32 Farklı pH değerlerinin 55°C'de tespit edilen *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkileri99
- 4.33 Farklı pH değerlerinde 55°C'de *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz enziminin stabilitesi.....99

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.34 Kitosanaz için, Michaelis-Menten grafiği (A) ve Lineweaver-Burk grafiği (B). Enzim aktivitesi 55°C ve pH 5.5'te belirlenmiştir.	102
4.35 Farklı metal iyonlarının ve bazı kimyasalların 5 mM konsantrasyonda kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkileri	104
4.36 HyperRez XP Carbohydrate H ⁺ kolonu ile yapılan kitobiyoz, kitotrioz, kitotetroz, kitopentoz ve kitoheksoz analizlerinin üst üste çakıştırıldığı kromotogram	107
4.37 Phenomenex RNM-Carbohydrate Na + kolonu ile yapılan kitobiyoz, kitotrioz ve kitotetroz analizlerinin üst üste çakıştırıldığı kromotogram.....	108
4.38 Shodex Asahipak NH2P-50 4E kolonu ile yapılan kitobiyoz, kitotrioz, kitotetroz, kitopentoz ve kitoheksoz analizlerinin HPLC kromotogramları	109
4.39 Hypersil APS-2 Amino kolonu ile optimize edilmiş gradyan yöntemi kullanılarak yapılan kitobiyoz, kitotrioz, kitotetroz, kitopentoz ve kitoheksoz analizlerinin HPLC kromotogramları	110
4.40 Kitooligosakkarit standartlarının kalibrasyon eğrileri	111
4.41 Farklı konsantrasyonlarda aseton kullanılarak SPE kolonu ile konsantre edilmiş kitooligosakkarit karışımının HPLC kromatogramları. 1-%10, 2-%20, 3-%30, 4-%40, 5-%50	114
4.42 Farklı konsantrasyonlarda asetonitril kullanılarak SPE kolonu ile konsantre edilmiş kitooligosakkarit karışımının HPLC kromatogramları. 1-%10, 2-%20, 3-%30, 4-%40, 5-%50	114

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.43 Farklı konsantrasyonlarda metanol kullanılarak SPE kolonu ile konsantre edilmiş kitooligosakkarit karışımının HPLC kromatogramları. 1-%10, 2-%20, 3-%30, 4-%40, 5-%50	115
4.44 <i>B. cereus</i> EGE-B-6.1m'in ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları	117
4.45 <i>B. thuringiensis</i> EGE-B-14.7i'nin ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları	117
4.46 <i>B. mycoides</i> EGE-B-19.3'un ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları	118
4.47 <i>B. thuringiensis</i> EGE-B-28.2'nin ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları	118
4.48 <i>B. cereus</i> EGE-B-2.5m'in ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları	119
4.49 <i>B. mycoides</i> EGE-B-44.1'in ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları	119
4.50 <i>B. cereus</i> EGE-B-5.5m'in ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları	120
4.51 <i>B. subtilis</i> EGE-B-36.5'in ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları	120
4.52 <i>B. cereus</i> EGE-B-10.4i'nin ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları	121
4.53 <i>B. thuringiensis</i> EGE-B-3.5m'in ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları	121

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.54 *B. cereus* EGE-B-4.1i'nin ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları 122
- 4.55 *B. cereus* EGE-B-4.2i'nin ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları 122
- 4.56 *B. mojavensis* EGE-B-5.2i'nin ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları 123
- 4.57 *B. subtilis* EGE-B-1.19'un ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları 123

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Farklı kitooligosakkarit ürünlerinin antimikrobiyal aktiviteleri	19
2.2 Farklı kitooligosakkarit ürünlerinin antioksidan aktiviteleri	21
2.3 Farklı kitooligosakkaritlerin anti-inflamatuvar aktiviteleri	22
2.4 Farklı kitooligosakkaritlerin ürünlerinin anti-kanser aktiviteleri	24
2.5 Farklı kitooligosakkarit ürünlerinin immünostimülasyon aktiviteleri	25
2.6 Kitooligosakkaritlerin ticari üretimi	29
3.1 Çalışmada kullanılan <i>Bacillus</i> suşları ve kodları	31
3.2 Saflaştırılmış enzimin substrat özgünlüğü çalışmasında kullanılan substratlar ve kullanım şekilleri	49
4.1 <i>Bacillus</i> suşlarının maksimum kitinaz aktiviteleri, protein konsantrasyonları ve spesifik aktiviteleri ile optimum kültürasyon süreleri	74
4.2 Literatürde bildirilen farklı <i>Bacillus</i> spp'nin kitinaz aktiviteleri	75
4.3 <i>Bacillus</i> suşlarının maksimum kitosanaz aktiviteleri, protein konsantrasyonları ve spesifik aktiviteleri ile optimum kültürasyon süresi ...	75
4.4 Literatürde bildirilen farklı <i>Bacillus</i> spp'nin kitosanaz aktiviteleri	76
4.5 Çeşitli karbon kaynakları ve kombinasyonları ile büyütülen <i>B. mojavensis</i> EGE-B-5.2i'nin kitosanaz aktivitesi	77
4.6 Çeşitli azot kaynakları ile büyütülen <i>B. mojavensis</i> EGE-B-5.2i'nin kitosanaz aktivitesi	79

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge

Sayfa

4.7 On bir değişken ve bunların düzeyleri için dizayn Plackett Burman matrisi ile kitosanaz aktivitesinin tahmin ve deneysel değerleri	81
4.8 Kitosanaz üretimi için PB tasarımının regresyon analizi.....	83
4.9 CCD için, $\alpha \pm 2$ dahil olmak üzere düşük, orta ve yüksek değerleri	83
4.10 Dört değişken için merkezi kompozit tasarım matrisi ve kitosanaz aktivitesinin tahmin ve deneysel değerleri	85
4.11 Merkezi Kompozit Tasarımın deney sonuçları için ANOVA	86
4.12 <i>Bacillus mojavensis</i> 'in kitosanaz aktivitesinin literatürde bildirilen <i>Bacillus</i> suşlarıyla karşılaştırılması	90
4.13 Optimize edilmemiş fermantasyon ortamda ve optimize edilmiş ortamda kitosanaz aktivitesi, kültür süpernatantındaki protein konsantrasyonu ve biyokütle miktarı	92
4.14 <i>Bacillus mojavensis</i> EGE-B-5.2i'nin kitosanazın saflaştırma adımlarının özeti	93
4.15 Çeşitli <i>Bacillus</i> suşlarıyla yapılmış kitosanaz saflaştırma çalışmalarının karşılaştırılması	95
4.16 <i>Bacillus mojavensis</i> EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz enziminin substrat özgüllüğü	100
4.17 <i>Bacillus mojavensis</i> EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz enzimi karakteristiklerinin literatürde yer alan <i>Bacillus</i> kitosanazları ile karşılaştırılması.....	101

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)ÇizelgeSayfa

- 4.18 Farklı *Bacillus* suşlarının ham kitosanaz enzim çözeltileri ile üretilen kitooligosakkaritler125
- 4.19 Kitooligosakkaritlerin enzimatik üretimi126
- 4.20 Çalışmamızda enzimatik olarak üretilen kitooligosakkaritlerin alıkonma süreleri127

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

rpm	devir sayısı/dakika (revolution per minute)
ppm	milyonda bir (Parts per million)
α	alfa değeri
cps	sentipoze (centipoise)

Kısaltmalar

GlcN	Glukozamin
GlcNAc	N-asetilglukozamin
FA	N-asetillenmiş kalıntıların fraksiyonu
DA	N-asetilasyon derecesi (degree of N-acetylation)
DP	Polimerizasyon derecesi (degree of polymerization)
MW	Moleküler ağırlık (Molecular Weight)
PD	Moleküler ağırlık dağılımı (Molecular weight distribution)
PA	N-asetilasyon deseni (Pattern of N-acetylation)
COS	Kitooligosakkarit
NA-COS	N-asetil-kitooligosakkarit
DD	Deasetilasyon derecesi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

HILIC	Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (Hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPAEC-PAD	Palslı amperometrik deteksiyon ile yüksek performanslı anyon değiştirme kromatografisi (High performance anionic exchange chromatography with pulsed amperometric detection)
CE	Kapiler elektroforez (Capillary electrophoresis)
FT-IR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopi
NMR	Nükleer manyetik rezonans
MALDI-TOF	Matris yardımıyla lazerle desorpsiyon / iyonizasyon süresince kütle spektrometresi
ANOVA	Varyans analizi
SD	Standart sapma (Standard deviation)
CCD	Merkezi tümleşik tasarım (Central composite design)
CSL	Mısır ıslatma (maserasyon) sıvısı (Corn steep liquor)
RSM	Yanıt yüzeyi yöntemi (Response Surface Methodology)



1. GİRİŞ

Kitin, eklem bacaklıların dış iskeletini oluşturan sert kabukları, böcek kütikülaları ve fungus hücre duvarında biyokütle olarak selülozdan sonra en yaygın bulunan β -1,4 bağlı N-asetilglukozaminin (GlcNAc) suda çözünmeyen bir polimerdir (Artan, 2010; Heggset et al., 2010; Mahata et al., 2014). Kitin, biyokimyasal uygulamalar, gıda ve çeşitli kimya endüstrilerinde geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile üretilen doğal ve toksik olmayan bir biyopolimerdir. Kitosan, suda çözünmeyen, ancak organik asitlerin sulu solüsyonlarında çözünen, β -1,4-N-asetil-glukosamin ve β -1,4-glukosaminden oluşan linear bir polisakkarittir (Swiatkiewicz et al., 2015).

Kitin ve kitosan, klitooligomerler veya kitooligosakkarit (COS) adı verilen suda çözünür oligomerleri elde etmek için kimyasal ve enzimatik yöntemlerle indirgenebilmektedir. Kitooligosakkaritlerin polimerizasyon derecesi (DP) <20 ve ortalama molekül ağırlığı $<3,9$ kDa'dır (Lodhi et al., 2014; Mahata et al., 2014). Toksik olmayan kitooligosakkaritler suda çözünebilmekte ve biyolojik olarak parçalanabilmektedirler. Kitooligosakkaritler antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitümöral ve antioksidan, immünostimülasyon, kan basıncını düşürücü ve hipokolesteromik aktivite gibi çok sayıda biyolojik aktiviteye sahiptir (Kim and Rajapakse, 2005; Prashanth and Tharanathan, 2007; Wang et al., 2015). Nispeten yüksek DP ve düşük molekül ağırlıklı (MW) kitooligosakkaritlerin, düşük DP oligomerlerinden biyolojik olarak daha aktif olduğu tespit edilmiştir (Prashanth and Tharanathan, 2007).

Kitooligosakkaritler çoğunlukla kitin ve kitosanın kimyasal veya enzimatik hidroliziyle elde edilmektedir. Ancak enzimatik hidroliz yöntemi, yüksek özgünlük, ılımlı reaksiyon koşulları ve kontrollü işlemler nedeniyle biyoaktif kitooligosakkarit sentezi için tercih edilmektedir (de Araújo et al., 2016). Kimyasal hidrolizinden farklı olarak, kitin ve kitosanın enzimler tarafından biyolojik olarak parçalanması toksik kimyasalların kullanılmasını gerektirmemekte ve bu sayede aşırı miktarda zararlı atık üretiminin önüne geçilebilmektedir. Bu nedenle, kitin ve kitosanı modifiye edici enzimler biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalarda spesifik fonksiyonlara ve güvenilir

performansa sahip kitin ve kitosan oligosakkaritlerini üretmek için uygun araçlar olarak giderek artan bir ilgiye sahiptir (Nampally et al., 2015).

Kitinazlar [EC 3.2.1.14] ve kitosanazlar [EC 3.2.1.132] şeker birimleri arasındaki glikozidik bağları hidrolize ederek, kitin ve kitosanları kitoooligosakkarite dönüştürebilen glikosidik hidrolazlardır (Heggset et al., 2010). Kitinazlar virüs, bakteri, fungus, böcekler, yüksek bitkiler ve hayvanlar da dahil olmak üzere çok çeşitli organizmalarda bulunmaktadır (Dahiya et al., 2006). Kitosanazlar da bakteri, fungus, virüs ve bitkiler gibi çeşitli organizmalarda tespit edilmiştir. Bakteri genusları arasında *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Myxobacter*, *Enterobacter*, *Streptomyces* ve *Nocardia*'nın kitosanaz üretebilen suşlara sahip oldukları açıklanmıştır (Muslim et al., 2016).

Endüstriyel açıdan önemli birçok suşu ile ticari enzim üretiminin neredeyse yarısı *Bacillus* suşları ile gerçekleştirilmektedir (Beg and Gupta, 2003). Yapılan araştırmalarda, *Bacillus* spp. tarafından kitosanaz üretimi tespit edilerek, kitosanın enzimatik hidrolizinde kullanıldığı çeşitli araştırmalar mevcuttur (Lee et al., 1996a; Choi et al., 2004; Liang et al., 2012). Günümüzde kitoooligosakkaritlerin biyolojik üretimi için spesifik kitinolitik enzimlerin kullanımı önemli derecede artış göstermiştir ancak, mevcut ticari enzimler nedeniyle enzimatik kitoooligosakkarit üretimi halen ekonomik olarak tercih edilen bir yöntem değildir. Sonuç olarak, ticari potansiyele sahip yeni mikrobiyal kitinazların ve kitosanazların keşfi bilim adamlarının öncelikli tercihidir.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Biymühendislik Bölümü, *Bacillus* Kültür Koleksiyonu'nda bulunan ve kitinolitik enzimleri ürettiği bilinen *Bacillus* suşları tarafından üretilen kitinolitik enzimler kullanarak kitoooligosakkarit sentezlemek üzere tasarlanmıştır. Çalışmanın temel amacı, farklı *Bacillus* suşlarının kitinaz ve kitozanaz aktivitelerini belirleyerek, bu enzimlerin biyolojik kitoooligosakkarit üretimi için kullanılabilirliğinin incelenmesi ve enzimatik olarak sentezlenmiş kitoooligosakkarit ürünlerinin kantitatif analizidir. Bir suşa ait kitinolitik enzimin kısmi saflaştırma ve karakterizasyonu da bu çalışmanın kapsamına dahildir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Kitin

Kitin, β -1,4 bağıyla bağlı iki N-asetilglukozamin (GlcNAc) biriminin tekrarlanmasıyla oluşan uzun zincirli ve selülozdan sonra dünya üzerinde en çok biyokütleyle sahip bir biyopolimerdir. Eklem bacaklıların dış iskeletini oluşturan sert kabukları, böceklerde kütikula ve fungus hücre duvarında yaygın olarak bulunmaktadır (Heggset et al., 2010; Mahata et al., 2014). Kitin ilk olarak Henry Braconnot tarafından mantardan 1811'de izole edilmiştir (Braconnot, 1811). Kitinin, α , β ve γ kitin olarak adlandırılan ve birim hücrenin hidrasyon derecesi ve boyutuna göre farklılık gösteren üç polimorfik formu mevcuttur. α ve β kitin sırasıyla anti-paralel ve paralel biçimde düzenlenmiş polisakkarit zincir tabakalarından oluşurken, γ kitin paralel olmayan tek zincirlerle serpilmiş paralel polisakkarit zincirleri içermektedir (Mekasha et al., 2017). Kitin biyolojik olarak bozunabilir özellikte ve biyoyumlu bir polimerdir., Bu nedenle kitinin biyomedikal uygulamalarına ait çok sayıda çalışma bildirilmiştir (Park and Kim, 2010). Bu özellikleri sayesinde kitin, gıda endüstrisi, tekstil endüstrisi, tarım, atıksu arıtımı, mikrobiyoloji, nanoteknoloji, kimya, malzeme bilimi, doku mühendisliği ve ilaç dağıtımı çalışmaları gibi çok geniş çaplı alanlarda uygulamaya sahiptir.

Kabuklu canlıların atık kabuklarında kitinin parçalanması zaman alan bir süreçtir. Bu nedenle deniz ürünü işleme atığının yok edilmesi, kabuklu deniz hayvanları üreten tüm ülkeler için çevresel bir probleme dönüşmüştür (Arbia, 2013). Kabuklu canlıların atık kabuklarının en iyi şekilde değerlendirilmesi ile kitin gibi değerli ürünler elde edilebilmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde kitinin en yaygın ticari kaynakları kabuklu canlıların atık kabuklarıdır. Dünyadaki kitin üretimi yıllık olarak yaklaşık 100 milyar ton civarındadır (Elieh-Ali-Komi and Hamblin, 2016). Üretilen kitinin çoğu, osteoartrit ağrısı hafifletmek için kullanılan, ABD'de önemli bir gıda takviyesi olan monosakkaritlerin üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır (Aam et al., 2010). Kitinin suda çözünmemesi nedeniyle canlılar üzerindeki uygulamaları sınırlıdır. Bu sorunun üstesinden

gelmek için kitin, birçok alanlarda artan uygulamaları nedeniyle en çok ilgi gören türevlerine dönüştürülmelidir.

2.2 Kitosan

Kitinin bir alkali çözelti ile muamele edilmesi ile elde edilmektedir. Kitosan, kitinin tamamen veya kısmen deasetillenmiş bir şeklidir. Bir biyopolimer olarak kitosan, β -1,4-GlcNAc'yi içeren linear bir polisakkarittir. Doğaldır ve toksik özellik göstermemektedir. Kitosan suda çözünmemekte, ancak sulu organik asit solüsyonlarında çözünür hale gelmektedir (de Assis et al., 2010). Kitin aksine, kitosan hayvanlarda bulunan bir bileşen değildir ve doğada nadiren bulunur. Yengeç ve karides kabukları, kalamar ve mürekkepbalığı kemik plakaları da dahil olmak üzere birçok doğal kitin kaynağı, kitosan içermemektedir. Ancak fungusların hücre çeperlerinde hem kitin hem de kitosan sentezlenmektedir (Nwe et al., 2009). Kitosan, Zygomycetes sınıfındaki fungusların hücre duvarının önemli bir bileşenidir (Chatterjee et al., 2005). Kitosan doğal olarak, Basidiomycetes, Ascomycetes ve Phycomycetes sınıfındaki fungusların miselleri, sapları ve sporlarında da bulunmaktadır (Logesh et al., 2012). Muzzarelli et al. (2012), yaptıkları çalışmada, hem mayaların hücre duvarlarında hem de filamentli fungusların septasında kitin ve kitosan tespit etmişlerdir.

Kitosan, fungusların hücre duvarında iki farklı formda bulunmaktadır. Bunlar, glukana bağlı kitosan ve serbest haldeki kitosan formu (Nwe et al., 2009). Doğal kaynaklardan doğrudan kitosan elde etmek için çeşitli yöntemler mevcuttur. Fungal hücre duvarlarından elde edilen kitosanın kalitesi ve miktarı fungusun türlerine, fermantasyon koşullarına ve ekstraksiyon prosedürlerine bağlıdır. Kabuklulardan elde edilen kitosan, düşük polidispersite ile yüksek molekül ağırlığı, %20'nin altında N-asetilasyon derecesine (DA) ve çözelti viskozitesinin %1'i oranında 500-1700 sentipoze (cps)'a sahiptir. Fungal kitosan ise yüksek polidispersiteye sahip düşük bir MW'ye, DA %15'den daha düşük ve %10'luk bir çözelti viskozitesi 10-15 cps'ye sahiptir. (Nwe et al., 2009).

Ticari kitosan polimeri, çoğunlukla doğal kitinin deasetilasyonundan elde edilmektedir ve yıllık üretimi birkaç gigaton olarak bildirilmiştir (El Kadib, 2016).

Kitosanın küresel piyasasının 2018 yılına kadar 118.000 tonun üzerine çıkması ve tedarikçilerin bu talebi karşılamada sıkıntı çekebileceği öngörülmektedir (Gómez-Ríos et al., 2017). Yıllık yaklaşık 150.000 ton endüstriyel olarak kullanılabilir kitosan, deniz ürünlerinin işlenmesinin yan ürünü olarak elde edilen kitinin dönüştürülmesi ile elde edilmektedir. Üretilen kitosanın büyük bir kısmı kozmetik ürünler, organik gübre ve gıda takviyelerinde kullanılmaktadır (Fernandez and Ingber, 2014).

Kitin ve kitosan, D-glukozamin birimlerinin asetilasyon derecesine göre farklılaştırılabilir. Kitin %70 ve üzeri asetillenmiş birimler içerirken, kitosan ise en az %70 deasetillenmiş (en fazla %30 oranında asetillenmiş) olmalıdır. Formik asit, asetik asit ve askorbik asit gibi organik asitler varlığında, kitosan tuzları oluşmakta ve sonuçta kitosan, suda çözünebilir hale gelmektedir (Uragami and Tokura, 2006). Kitosan sırasıyla C-2, C-3 ve C-6 pozisyonlarında iki primer ve sekonder hidroksil grubu ile birlikte bir amino- veya N-asetamid grubu olmak üzere üç reaktif fonksiyonel grup içerir. Farklı kitosanların yapısı ve fizikokimyasal özellikleri arasındaki temel fark, amino veya N-asetamid gruplarıdır (Xia et al., 2011). Kitosan, N-asetil kalıntılarının fraksiyonuna (FA), N-asetilasyon derecesine (DA), polimerizasyon derecesine (DP), molekül ağırlığı (MW), MW dağılımına (PD veya Polidispersite) ve N-asetilasyon ya da sekans desenine göre sınıflandırılabilir (Aam et al., 2010). Kitosan, biyouyumluluk, biyobozunabilirlik ve düşük toksisite gibi fizikokimyasal özelliklerinden dolayı çeşitli endüstrilerdeki uygulamalar için büyük potansiyele sahiptir. Kitosan, biyolojik açıdan kitosandan daha aktif olan düşük moleküler ağırlıklı türevlerine hidroliz edilebilmektedir.

2.3 Kitooligosakkaritler

Kitosan, değişken polimerizasyon derecelerine (DP) sahip kitosan oligomerleri üretmek için hidrolitik ajanlarla parçalanan oldukça kararsız glikozidik bağlar içermektedir (Kim and Rajapakse, 2005). DP'si 20'den az ve ortalama moleküler ağırlığı 3,9 kDa'nın altında olan kitosanlara, kitooligosakkaritler (COS), kitosan oligomerleri veya kitooligomerler adı verilmektedir (Lodhi et al., 2014; Mahata et al., 2014). Kitooligosakkaritler geniş

bir biyolojik aktiviteye sahiptir. Tıp, kozmetik, gıda ve tarım gibi birçok alanda umut vadeden uygulamaları vardır (Fernandes et al., 2008; Dou et al., 2009). Düşük moleküler ağırlıklı ve suda çözünür kitosanlar olarak kabul edilen kitooligosakkaritler, ticari olarak öncü molekülden daha fazla talep görmektedir.

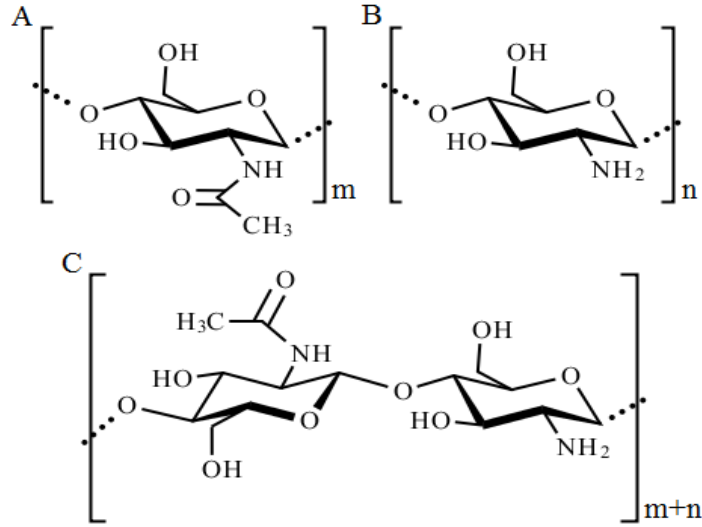
2.4 Kitooligosakkaritlerin Özellikleri

Kitooligosakkaritler genel olarak β -1,4-O-glikosid bağı ile bağlanmış GlcNAc veya glukosamin (GlcN) birimlerinden oluşmaktadır. Kitooligosakkaritler belirlenmiş bir polimerizasyon derecesi (DP) ve farklı N-asetilasyon derecesi ile üretilebilir, ancak, bunların N-asetilasyon ya da sekans deseni her zaman tesadüfi olmaktadır (Hamer et al., 2015). Homokitooligosakkaritler GlcN (D birimi) veya GlcNAc (A birimi) oligomerleridir ve sadece D veya A birimlerinden oluşurken, heterokitooligosakkaritler hem D hem de A birimlerinden oluşmaktadır. Heterokitooligosakkaritlerin DP, N-asetilasyon derecesi (DA), deasetilasyon derecesi (DD) ve oligomer zincirindeki N-asetil kalıntılarının konumu değişmektedir. DP 10'dan az olan heterokitooligosakkaritler suda çözünebilirken DP 10'dan daha fazla olanların suda çözünürlüğü N-asetilasyon derecesi'ya ve çözeltinin pH'sına bağlıdır. Gıda endüstrisi, ilaç endüstrisi ve araştırma faaliyetlerinde sıklıkla heterokitooligosakkaritler kullanılmaktadırlar (Il'ina and Varlamov, 2015). Birkaç monomer biriminden oluşan kitooligosakkaritlere oligomer adı verilir ve bir oligomer içindeki monomerik birimlerin sayısı polimerizasyon derecesi (DP) olarak adlandırılır. Bir tetra-sakkarit (DP 4), bir penta-sakkaritten (DP 5) daha düşük bir oligomerdir. Farklı kitooligosakkaritler aynı DP'ye sahipken farklı N-asetil kalıntılarının fraksiyonu (FA)'ya sahip olabilmektedir. Aynı DP'nin oligomerleri (aynı sayıda monomerik birimlere sahip) ancak farklı FA değerlerinde homologlardır. Örneğin, penta-sakkarit D4A1 (FA 0,2), penta-sakkarit D2A3'ün (FA 0,6) daha düşük bir FA homologudur. Bir oligomer içeren homologların sayısı DP+1'dir. Belirli bir homolog göz önüne alındığında, D ve A birimlerinin diziliminde farklı olan ama aynı DP ve FA'ya sahip izomerler de mevcut olabilmektedir (Kim, 2010).

Kitooligosakkaritlerin polimerizasyon derecesi (DP), bir segmentte 2 ila 20 birim arasında değişmekte ve her bir N-asetil kalıntılarının fraksiyonu bölümünde D ve A kalıntıların dizilimleri farklılık göstermektedir. D-glukozamin birimlerinin kısa zincir uzunlukları ve serbest amino gruplarına bağlı olması sebebiyle fizyolojik koşullar altında kitooligosakkaritlerin suda çözünbildiği ve düşük viskozite gösterdiği düşünülmektedir (Bahrke, 2017). Kitooligosakkaritler, aseton, bütanol, etanol, etil asetat, propanol ve piridin içinde çözünmezken, metanol ve dimetil sülfoksitte kısmen çözünmekte ve suda tamamen çözünbilmektedir. DP 2-4'lü kitooligosakkaritler, metanolde çözünabilir, ancak DP> 5'in metanoldeki çözünürlüğü azdır (Mourya et al., 2011). Diğer şekerler gibi kitooligosakkaritler de ootoksidasyona karşı duyarlıdır, kuru ve inert koşullarda ortam sıcaklığında tutulmalıdır. Uzun süreli saklama için sıcaklık 20°C'nin altında tutulmalıdır. Kitooligosakkaritlerin raf ömrü, C vitamini veya sodyum klorür tuzlar gibi antioksidanlarla birlikte depolandığında önemli ölçüde artmaktadır (Bahrke, 2017).

Kitin ve kitosanın aksine suda çözünürlük, hücre zarı penetrasyonu, kolay emilme ve çeşitli biyolojik aktiviteleri gibi avantajlı özellikleri kitooligosakkaritleri son derece değerli bir ürün haline getirmektedir. Bu nedenle, son zamanlarda, kitooligosakkaritler, dünya çapında çok sayıda araştırmacı tarafından artan bir ilgi görmektedir. Nispeten yüksek DP (6 veya daha yüksek) ve düşük moleküler ağırlıklı kitooligosakkaritlerin, düşük DP ve yüksek moleküler ağırlıklı oligomerlere göre biyolojik olarak daha aktif olduğu tespit edilmiştir (Prashanth and Tharanathan, 2007). Bu nedenle, DP ve MW'in kitooligosakkaritlerin fizikokimyasal özelliklerini ve biyolojik faaliyetlerini doğrudan etkileyen temel özellikler ve anahtar faktörler olduğu düşünülmektedir.

Aynı DP'ye sahip kitooligosakkaritlerin özellikleri N-asetilasyon derecesi (DA)'daki fark veya asetil gruplarının düzenlenmesi nedeniyle farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle, kompleks kitooligosakkarit karışımlarının biyolojik aktivitelerinde hangi moleküllerin aktiviteden sorumlu olduğunu belirlemek zorlaşmaktadır (Mourya et al., 2011). N-asetil, N-deasetillenmiş ve kısmen N-deasetillenmiş kitooligosakkaritlerin kimyasal yapısı Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. N-asetillenmiş kitooligosakkaritin yapısı (A), N-deasetillenmiş kitooligosakkarit (B), ve kısmen N-deasetillenmiş kitooligosakkarit (C), m = polimerizasyon derecesi (DP) = 2-20, n = DP = 2-20 and $m+n$ = DP = 2-20.

2.5 Kitooligosakkaritlerin Sentezi

Kitin, suda çözünür kitin oligosakkaritleri veya N-asetil kitooligosakkarit (NA-COS) elde etmek için kimyasal ve enzimatik yöntemlerle hidrolize edilebilmektedir (Wang et al., 2008b). Kitooligosakkaritler, kitin veya kitosanın fiziksel, kimyasal ve enzimatik parçalanması yoluyla elde edilebilmektedir. Kitooligosakkaritlerin biyolojik aktiviteleri, N-asetilasyon derecesi, polimerizasyon derecesi, molekül ağırlığı, N-asetil kalıntılarının fraksiyonu ve N-asetilasyon ya da sekans deseninden önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu nedenle, tekrarlanabilir prosesler ile COS sentezleme ve karakterize etme yöntemlerinin adaptasyonu, biyolojik aktivitelere ait bilgiyi geliştirmek için ön şarttır.

2.5.1 Fiziksel yöntemlerle kitooligosakkarit sentezi

Fiziksel yöntemler, ultrasonik radyasyon ve gama radyasyonu yöntemlerini içerir. Tam olarak deasetilatlanmış kitosanın ultrasonik depolimerizasyonu ile, DP 2-11'den maksimum DP 3 konsantrasyonuna kadar değişen polimerizasyon derecelerine sahip kitooligosakkaritlerin üretimi önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Popa-Nita et al., 2009). Düşük frekanslı ultrason gibi fiziksel yöntemler kısmi depolimerizasyona neden olmaktadır (Lodhi et al., 2014). Hai et al. (2003),

kitosanı depolimerize etmek için katı halde gama ışınlarını kullanarak farklı molekül ağırlıklarına sahip kitooligosakkaritler sentezlemiştir. Choi et al. (2002), kitosanı asetik asit çözeltisinde indirgemek için gama ışınlamasını kullanmış ve DP 2, DP 3 ve DP 4 kitooligosakkaritlerin üretimi ile bu çözeltinin viskozitesinde hızlı bir düşüş gözlemlemiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, kitooligosakkarit sentezi için fiziksel yöntemler üzerine sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır ve büyük ölçekli etkinlikleri henüz tespit edilmemiştir. Fakat kitooligosakkarit sentezi için kimyasal ve enzimatik yöntemler daha kapsamlı olarak incelenmiştir. Ayrıca, piyasada bulunan COS'ler genellikle, kitinin konsantre asitler ile hidrolizi ve kitin ve kitosanın enzimatik hidrolizi ile hazırlanmaktadır.

2.5.2 Kimyasal yöntemlerle kitooligosakkarit sentezi

En sık kullanılan geleneksel kitin ve kitosan parçalama yöntemi kimyasal hidrolizdir, ancak kimyasal reaksiyonlar çok karmaşık olup kontrol edilmesi zordur ve istenmeyen çeşitli ikincil bileşiklerin üretilmesine neden olabilmektedir. Kitooligosakkaritlerin hazırlanması için kimyasal yöntemler genellikle asit hidrolizini içermektedir. Geleneksel prosedürde, asit hidrolizi, nötrleştirme, demineralizasyon, aktif karbon kolon fraksiyonasyonu, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) fraksiyonasyonu ve liyofilizasyon (Jeon et al., 2000) yer almaktadır. Trombotto et al. (2008), DP 5 merkezli, DA 0-90 ve DP 2-12'den değişen, kitin veya kitosan oligomerlerinin homojen serisinin, GlcN karışımının kantitatif N-asetillenerek hazırlandığını bildirmiştir. Çalışmada N-deasetilatlanmış kitosanın asit hidrolizi ile elde edilen GlcN oligomer karışımının üretilmesini içeren iki aşamalı bir kimyasal proses kullanılmıştır. Ardından bu oligomerlerin GlcN birimleri bir hidrotropik asitten alkolik asetik anhidrür çözeltisi ile kısmen N-asetillenmiştir.

Asidik hidroliz prosedürlerinin çoğunda oligomerler, düşük DP ile, çoğunlukla monomerden tetramere değişen kantitatif verimle üretilmektedir veya bu prosedürler elverişli değildir. Yüksek DP'na sahip oligomerler üzerine fizyolojik etkiler ifade edilirken, nispeten daha yüksek DP'ye sahip pentamer ile heptamer arasındaki oligomerlerin verimi düşük bulunmuştur (Jeon et al., 2000).

Zorlu termokimyasal süreçler veya kuvvetli fiziksel kuvvetler üretilen oligosakaritlere kısmen zarar vermektedir. Bu durum daha sonraki aşamalarda, heterojen karışımlara sahip düşük kaliteli ürünlerin üretilmesine yol açmaktadır. Ayırma işlemlerindeki yüksek maliyetler ile birlikte kitooligosakkaritlerin düşük verimi, geleneksel hidroliz yöntemlerinde karşılaşılan diğer dezavantajlardır (Su et al., 2006).

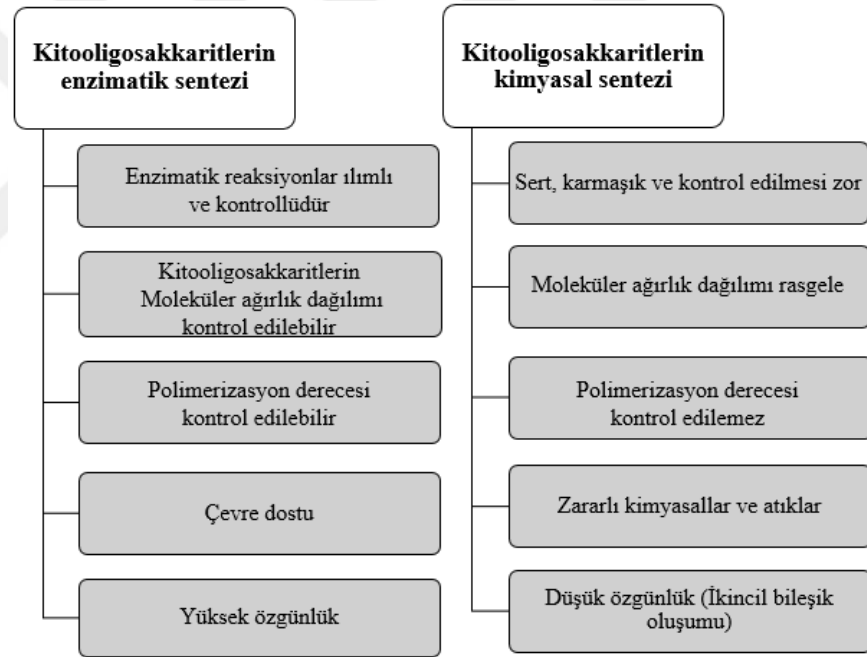
Suda çözünebilen kitosan homojen fazda fosfotungstik asit katalizörü ile hidrojen peroksit kullanılarak hazırlanmıştır. Ortaya çıkan ürünler, DP 2-9'un kitooligosakkaritlerden oluşmaktadır (Xia et al., 2013). Chang et al. (2001), kitin ve kitosanın hidrojen peroksit ile bozunmasının ultrasonik bozunumdan çok daha hızlı olduğunu ve enzimatik hidroliz ile karşılaştırılabilir olduğunu bildirmiştir. GlcN ve kitooligosakkaritler düşük konsantrasyonda hidrojen peroksit kullanılarak 80°C'de üretilmiştir. Parçalanma ürününün HPLC analizi, GlcN ve kitooligosakkaritlerin (DP 1-10) varlığını göstermiştir..

2.5.3 Enzimatik yöntemlerle kitooligosakkarit sentezi

Kitooligosakkaritlerin sentezi için kullanılan enzimatik yöntemler, diğer geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında nispeten en etkili yöntemlerdir (Aam et al., 2010). Kitooligosakkaritlerin enzimatik sentezi, spesifik kitinazlar, kitosanazlar ve spesifik olmayan karbonhidraz ve proteaz enzimleri kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir (Kim, 2010). Kitin ve kitosanın enzimatik bozunması, geleneksel yöntemlere göre çeşitli avantajlara sahiptir. Bu nedenle enzimatik sentez yöntemleri, kimyasal ya da fiziksel uygulamalar yerine hassas hidroliz özgülüğü, kitooligosakkaritin sentezi için alternatif bir yaklaşım olarak önerilmiştir. Uzun kitooligosakkarit zincirleri elde etmek için enzimlerin kullanılması ilgi çekici bir yöntemdir ve bu yaklaşım dimer (DP 2) ile oktamer (DP 8) arasında değişen kitooligosakkaritlerin sentezinde başarıyla kullanılmıştır (Choi et al., 2004). Enzimatik yöntemler, kimyasal ve fiziksel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha ılımlı ve bu yöntemlerde kitooligosakkaritlerin molekül ağırlığı dağılımı kontrol edilebilmektedir (Villa-Lerma et al., 2013; Lodhi et al., 2014). Kitin ve kitosanın asit hidrolizi ile değişken polimerizasyon derecesi (DP)'ne sahip ve daha fazla GlcN ile daha az sayıda oligomer üretilirken,

enzimatik hidroliz yöntemi ile istenilen DP ve deasetilasyon derecesi (DD) ile hidroliz ürünleri elde edilebilmektedir. DP ve DD, kitooligosakkaritlerin potansiyel uygulama ve biyolojik aktivitesini belirlemektedir.

Şekil 2.2’de kitooligosakkaritlerin enzimatik ve kimyasal sentezi karşılaştırılmaktadır. Enzimatik yöntemle kitin ve kitosan hidrolizi kontrol edilmesi kolay ve çevre dostu işlemlerdir. Kimyasal bozunumun aksine, kitin veya kitosanın enzimatik hidrolizi, zararlı kimyasalların kullanılmasını gerektirmemekte ve zararlı herhangi bir atık üretmemektedir. Bu nedenle kitin ve kitosan hidrolizinde görevli enzimler, tutarlı performansları sayesinde biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalarda artan bir ilgi görmektedir (Nampally et al., 2015).



Şekil 2.2. Kitooligosakkaritlerin enzimatik ve kimyasal sentezi.

2.6 Kitinolitik Enzimler

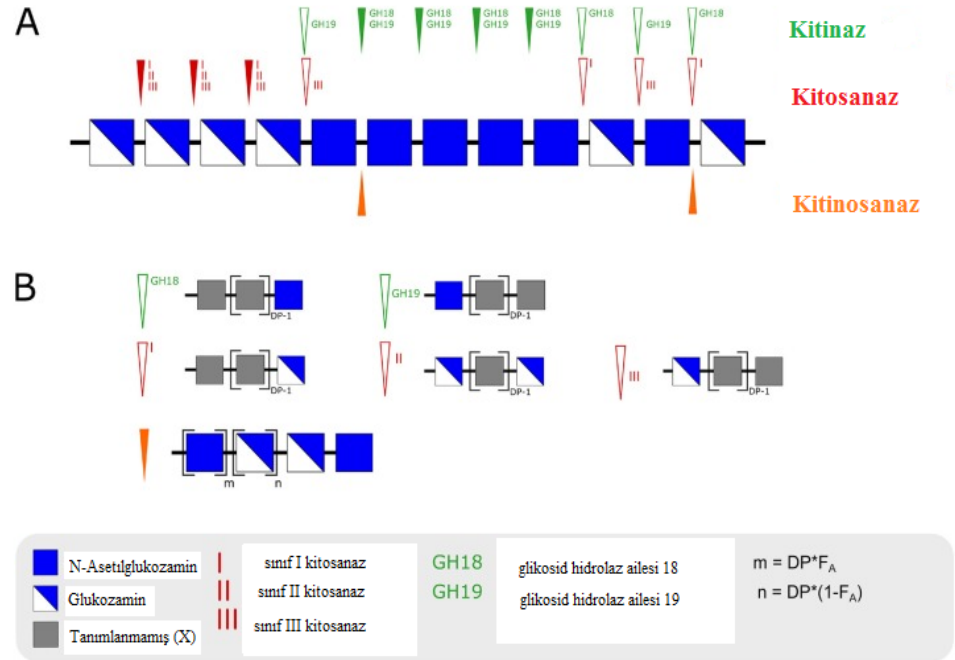
Kitin/kitosanın bozunmasından sorumlu olan enzimler kitinazlar ve kitosanazlardır. Kitinazlar ve kitosanazlar, şeker birimleri arasındaki glikozidik bağları hidrolize ederek, kitin ve kitosanı, düşük molekül ağırlıklı kitooligosakkaritlere dönüştürebilen glikosidik hidrolazlardır (Heggset et al.,

2010). O-glikozid hidrolaz süper ailesinin bir üyesi olan kitinazlar (EC 3.2.1.14), kitinin en ekonomik şekilde hidrolize edilmesi için önemli bir yere sahiptir. Kitinazlar, 18 ve 19 ailesi olarak adlandırılan glikozil hidrolazların (GH) iki ayrı ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadır. Aile 18 bakteriler, funguslar, virüsler, hayvanlardan bitkilerden gelen kitinazların sınıf III veya sınıf V kitinazları kapsarken, aile 19, I, II veya IV bitki kitinazlarını ve bazı *Streptomyces* veya diğer *Actinobacteria* suşlarında mevcut olanları kapsamaktadır (Slimene et al., 2015). Kitinazlar, virüsler, bakteri, fungus, böcekler, yüksek bitkiler ve hayvanlar da dahil olmak üzere çok çeşitli organizmalarda bulunmaktadır. Bu organizmalarda kitinazların rolleri çok çeşitlidir (Dahiya et al., 2006). Bakterilerde, kitinazlar beslenme ve parazitlikte rol oynamaktadır. Bahsedilen bu potansiyel uygulamalara ek olarak, kitinazlar kitooligosakkaritlerin üretimi için de kullanılabilmektedir (Wen et al., 2002).

Kitosanazlar (EC 3.2.1.132), kitosanın glikozidik bağlantısında etkili olan, enzimatik reaksiyon sonucu spesifik son ürünler olarak düşük molekül ağırlıklı kitooligomer eldesini sağlayan hidrolitik enzimlerdir. Kitosanazlar, kitosanın β -1,4 glikosidik bağlantısının hidrolizini katalizleyen endo- enzimlerdir. Bu enzimler *Bacillus* spp. dahil olmak üzere çeşitli bakterilerde bol miktarda tespit edilmiştir. Çeşitli alanlardaki geniş uygulama alanlarından dolayı kitosanazlarla ilgili son zamanlarda yapılan araştırmalar, büyük ilgi görmektedir. Kitosanazların en pratik ve umut verici uygulamalardan biri, biyoaktif kitooligosakkaritlerin hazırlanmasıdır (Liang et al., 2015). Sonuç olarak, kitosanazlar, kitosan substratlardan kitooligomerlerin enzimatik eldesi için başarıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, ticari uygulamalar için kitosanazların kitlesel üretimi sınırlıdır. Bu nedenle, yüksek verimle kitosanaz enzimi üreten mikroorganizmaların taranması, ekonomik bir üretim ortamının belirlenerek, kitosanaz üretiminin daha ekonomik hale getirilmesi için araştırmalar yoğunlaşmıştır (Nidheesh et al., 2015). Yapılarına bağlı olarak, kitinazlar ve kitosanazlar, CAZy veritabanında farklı glikozil hidrolaz (GH) ailelerinde gruplanmıştır. Bunlar, kitinazlar için GH 18, 19, 23, 48 ve kitosanazlar için GH 3, 5, 7, 46, 75, 80'dir. Bunlar, tipik olarak dört ve altı alt bölüm içeren etkin bölgelerinde belirli sayıda şeker kalıntısı barındırmaktadır. Substrat spesifitesine

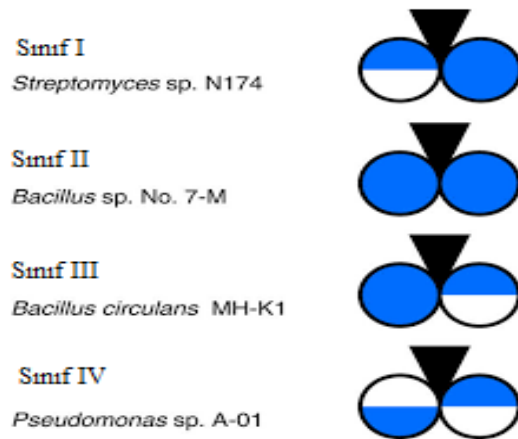
bağlı olarak, bu enzimler kitinazlar ya da kitosanazlar olarak sınıflandırılmaktadır (Kohlhoff et al., 2017).

Kitosanazlar ile ilgili son çalışmalar, bazı kitosanazların GlcNAc-GlcN bağını hidroliz etmediğini, ancak GlcN-GlcN ve GlcN-GlcNAc gibi diğer bağ türlerini hidroliz ettiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle, kitosanazların ayırma spesifiteleri çeşitlidir ve bu enzimlerin sınıflandırma kriteri olarak kullanılmaktadır. Kitosanazların alt sınıfları: alt sınıf I enzimleri GlcN-GlcN ve GlcNAc-GlcN bağlarını parçalarken, alt sınıf II enzimleri sadece GlcN-GlcN bağını ayırmaktadır. Alt sınıf III enzimleri GlcN-GlcN ile GlcN-GlcNAc bağlarını ve alt sınıf IV enzimleri GlcNAc-GlcN ve GlcN-GlcNAc ile GlcN-GlcN bağlarını da ayırmaktadır (Shinya and Fukamizo, 2017). Yapılan güncel bir araştırmada *Alternaria alternata*'dan, kitin ve kitosan oligomerlerini parçalayamayan, ancak bunun yerine kısmen asetillenmiş kitosanları parçalayabilen yeni bir tipte kitosanolitik enzimin izolasyonu ve karakterizasyonunu bildirmiştir. Bu enzim, ayrılma özgünlüğü ile karakterize edilen yeni bir kitosan hidrolaz sınıfının ilk üyesi olan bir kitinosanaz (Şekil 2.3) olarak tanımlanmıştır (Kohlhoff et al., 2017).



Şekil 2.3. Yarımla spesifiklerinin şematik gösterimi (A) ve kitinazların, kitosanazların ve yeni önerilen enzim sınıfı kitinosanazın (B) hidrolizi ürünleri (Kohlhoff et al., 2017).

Son yıllarda yapılan bir çalışma, diğer polisakkarit degradasyon enzimleri için potansiyel etkileri olan mevcut alt bölgeleri özgünlüklerine dayalı olarak, mevcut I-IV sınıflarına ait kitosanazların sınıflandırılmasını kökten değiştirmiştir (Weikert et al., 2017). Çalışma, tüm kitosanazların GlcN-GlcN'yi parçalayabildiğini açıklarken, sınıf I kitosanazlar, örneğin *Streptomyces* sp. N174 (GH 46'ya aittir) ek olarak GlcNAc-GlcN'yi parçalayabilir; *Bacillus circulans* MH-K1 (aynı zamanda GH 46'ya ait olan) gibi sınıf III kitosanazlar GlcN-GlcN'ye ilaveten GlcN-GlcNAc'yi de parçalayabilmektedir. Sınıf II enzimler, örneğin *Bacillus* sp. 7-M kitosanaz (GH 8'e aittir), GlcN-GlcN arasındaki bağlar ile sınırlanmıştır; *Pseudomonas* sp. A-0126'de yeni belirlenen sınıf IV GH 46 kitosanazlar ve *Amycolatopsis* sp. CsO-227, GlcNAc-GlcNAc haricindeki tüm bağları parçalayabilmektedir. *Streptomyces coelicolor* A3'den (2) kaynaklanan kitosanaz, GlcNAc'leri dahil etse de GlcNAc-GlcNAc'yi bile kapsayan tüm bağları parçalayabilmektedir; Bu tip özgülük için hiçbir sınıf mevcut değildir (Weikert et al., 2017). Çalışma ayrıca, kitosanazlar için kurulan sınıflandırma sisteminin çok basit olduğunu iddia etmektedir. En iyi karakterize edilmiş sınıf I-III kitosanazların substrat özelliklerini tekrar değerlendirmek için kısmen asetillenmiş kitoooligosakkaritlerin kantitatif olarak sıralamasında oldukça hassas bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışma sonuçlarına dayanarak, geçici olarak alt bölgelerin özgünlükleri ve tercihlerine (-2)-(+2) dayalı bir kitosanaz sınıflandırma sistemi önerilmiştir (Weikert et al., 2017).



Şekil 2.4. İlgili enzim kaynakları ile ilgili bölünme özgünlüğüne göre kitosanaz sınıflandırması. A birimleri beyaz, D birimleri mavi ile temsil edilir. Bir A birimi veya bir D birimi bulunabilen bir konum için daire yarı-beyaz ve yarı-mavi renktedir. Ayrılma noktası siyah bir ters üçgen ile gösterilir (Weikert et al., 2017).

2.7 Kitoooligosakkaritlerin Karakterizasyonu

Fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerle sentezlenen COS genellikle oligomerleri, homologları ve farklı moleküler ağırlıklı izomerlerini içeren bir karışım olarak elde edilir. Kitoooligosakkaritlerin reaksiyon karışımından ayrılması ve bunların yapısal karakterizasyonunun tamamlanması oldukça zordur. Ancak, kitoooligosakkaritlerin fizikokimyasal özellikleri ile biyoaktiviteleri arasındaki ilişkileri anlamak için tam bir karakterizasyonun yapılması son derece önemlidir. Biyolojik aktivitelerini değerlendirmek için iyi tanımlanmış, saf ve konsantre kitoooligosakkarit fraksiyonları gereklidir. Dahası, kitoooligosakkaritin biyomedikal ve gıda uygulamaları da, yüksek kalite, saflık ve doğru nicelik talep etmektedir.

Kitoooligosakkaritlerin saflaştırılması için jel filtrasyon (Sørbotten et al., 2005), ultrafiltrasyon (Lopatin et al., 2009) ve nanofiltrasyon (Dong et al., 2014) gibi çeşitli yöntemler daha önceki çalışmalarda açıklanmıştır. Kromatografik yöntemler, iyon değişim kromatografisi (Haebel et al., 2007) metal afinite kromatografisi (Le Dévédec et al., 2008), boyut eleme kromatografisi (Wu et al., 2012) ve jel permeasyon kromatografisi (Xing et al., 2017) gibi yöntemler kitoooligosakkaritlerin belirlenmesi ve ayrımı için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Pahalı ve büyük ölçekli ekipmanlara ihtiyaç duyulduğunda boyut ayırma yöntemleri ve ultrafiltrasyon membranları ile ilgili dezavantajları mevcuttur (Sinha et al., 2016).

HPLC, kitoooligosakkarit analizi ve ayrımı için sıklıkla kullanılmaktadır (Kumar, 2005; Li et al., 2012; Zou et al., 2015). Kitoooligosakkaritlerin güçlü polaritesi ve zayıf ultraviyole (UV) Emilimi, analitik kolon ve detektör seçimini belirlemektedir. Bu amaçla HPLC ile genellikle UV detektörü kullanılarak, asetil grubu nedeniyle COS, yaklaşık 210 nm'de absorbansta ölçülerek izlenebilmektedir. Refraktif indeks detektörü, N-asetillenmiş ve N-deasetillenmiş kitoooligosakkaritlerin HPLC analizi için tercih edilmekte ancak düşük duyarlılığa sahiptir ve gradyan elüsyon için uygun değildir (Cao et al., 2016). Kitoooligosakkaritlerin rutin HPLC yöntemleriyle ayrılması, esas olarak kitoooligosakkaritlerin çok hidrofilik doğasından ve HPLC kolonu üzerindeki zayıf tutulundan kaynaklanan bazı zorluklarla karşı karşıya kalmaktadır (Jiang et al.,

2014). Ayrıca HPLC, konsantre bir numune ve çok miktarda organik elüsyon solventi gerektirir (Dong et al., 2012). Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) kutupsal ve hidrofilik bileşiklerin ayrılması için umut verici bir teknik olarak önerilmektedir ve kitooligosakkarit karışımı (DP 2-6) başarıyla HILIC tarafından ayrılarak saflaştırılmıştır (Jiang et al., 2014). Hidrofilik etkileşim/zayıf katyon değişimi (HILIC/WCX) karışık yöntemli kromatografi ise ayrıca zayıf bir katyon değiştirme kolonu kullanılarak kitooligosakkaritlerin ayrılması için geliştirilmiştir (Dong et al., 2012). Bununla birlikte, katyon değişim tekniğinin seçiciliği ve verimliliği, özellikle yüksek DP ile kitooligosakkaritleri ayırmak için kullanıldığında yeterli değildir (Jiang et al., 2014). Bir çalışmada, kitooligosakkarit analizi, evaporatif bir ışık saçılım detektörü ve bir elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi (ESI-MS detektörü) ile birleştirilen ultra-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) yapılmıştır (Hamer et al., 2015). Pulsed amperometrik algılama (HPAEC-PAD) ile yüksek performanslı anyonik değişim kromatografisi, asbestsiz karbonhidratları ayırmada diğer bir güçlü, oldukça hassas ve verimli bir sistemdir. Son zamanlarda, Cao et al. (2016), türevlendirilmemiş kitooligosakkaritleri parçalayarak saptayan HPAEC-PAD yöntemini geliştirmiştir.

Kapiler elektroforez (CE) ise, yüksek çözme gücü ve HPLC'ye kıyasla yalnızca düşük miktarda örnek ve solvent ihtiyacı gibi avantajlar sunar. Elektroforetik hareketlilik asidik sulu çözeltideki monomer birimlerinin sayısına bağlı olduğu için bu yöntem kitooligosakkaritlerin ayrılması ve tespit edilmesi için kullanılabilir (Dong et al., 2012). Bu yöntem, kitooligosakkaritlerin başarılı bir şekilde ayrılması için çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır (Beaudoin et al., 2005; Blanes et al., 2008; Hattori et al., 2010). Ancak bu yöntem türevlendirme ve pahalı sarf malzemelere gereksinim duyması nedeniyle sınırlı kullanıma sahiptir. Fourier dönüşümü kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR) da kitooligosakkarit örneklerini analiz etmek ve karakterize etmek için birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (Kumar et al., 2005; Venkatesan et al., 2010; El-Sayed et al., 2017; Xu et al., 2017).

Kitooligosakkaritlerin yapısal analizi için, özellikle deasetilasyon derecesi (DD)'yi belirlemek için nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi

kullanılmaktadır. Diadların ve triadların frekanslarının NMR ile analizi, indirgeyici ve indirgenmemiş uç şekerlerdeki varyasyonlar hakkında bilgi vermektedir (Bahrke et al., 2002). ^1H -NMR (Sørbotten et al., 2005; Trombotto et al., 2008; Wu et al., 2012) ve ^{13}C -NMR kitooligosakkaritlerin karakterizasyonunda kullanılmıştır (Kumar et al., 2005; Venkatesan et al., 2010). Ancak, NMR spektroskopisi konsantre numune ile çalışmayı gerektirmektedir ve düşük DP'ye (<5) sahip kitooligosakkaritler ile sınırlıdır (Bahrke, 2017). Ayrıca NMR yöntemi sadece ortalama bir dağılımı belirleme yeteneğine sahiptir ve yapıda mevcut olabilecek bazı blok modellerin belirlenmesi problem yaratabilir. (Aam et al., 2010). Yapılan bir araştırmada, nispeten yüksek ve düşük molekül ağırlık değerlerine sahip olan kitooligosakkaritler de DD'nin değerlendirilmesi için, basit, hızlı, yaygın olarak adapte edilebilir, hassas, doğru, ucuz ve ticari olarak uygulanabilir iki yöntem keşfedilmiştir. Bunlar, bromokresol yeşil indikatörü ile bir asit-baz titrasyonu ve bir birinci dereceden türevli UV spektrofotometrik yöntemdir. Her iki yöntemin doğruluğu moleküler ağırlığın bir fonksiyonu olarak araştırılmış ve ^1H NMR spektroskopisi kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır (Jiang et al., 2017).

Matriks yardımcı lazerle desorpsiyon/ionizasyon kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) molekülleri tanımlamak, iyonlarının kütesini ve yükünü analiz ederek kimyasal yapılarını belirlemek için kullanılmaktadır. Bu yöntem, DA'nın bir fonksiyonu olarak aynı DP'nin kitooligomerleri içindeki kalıntı dağılımının tespit edilmesine olanak tanımaktadır (Bosquez-Molina and Zavaleta-Avejar, 2016). Ayrıca, MALDI-TOF MS, özellikle DP 3 ile 7 için DA'nın bir fonksiyonu olarak farklı oligomerlerin dağılımını incelemek için özellikle yararlı bulunmuştur (Trombotto et al., 2008). DP3, DP6, DP9 ve DP12'nin heterokitoogosakkaritlerinin dizi analizi, temel olarak kurulmuş türevlendirme yöntemleri ve MALDI-TOF postsource decay (PSD) MS'nin kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Bahrke et al., 2002). Çeşitli çalışmalar MALDI-TOF MS'yi, kitooligosakkarit fraksiyonlarını analiz etmek ve doğrulamak için kullanmıştır (Li et al., 2012; Wu et al., 2012; Cao et al., 2016). Hibrid QTOF ile kütle spektrometresi, kitooligosakkaritlerin molekül ağırlığını değerlendirmek için kullanılan yeni bir yöntemdir (Santos-Moriano et al., 2016).

2.8 Kitoooligosakkaritlerin Biyolojik Uygulamaları

Yüksek molekül ağırlığı , düşük çözünürlük ve yüksek viskoziteleri nedeniyle kitin ve kitosanın, biyolojik uygulamaları çeşitli alanlarda sınırlanmıştır. Öte yandan, kitoooligosakkaritler ise suda çözünürlük ve düşük molekül ağırlıklarınedeniyle büyük ölçekli ticari uygulamalarda çok daha fazla avantaja sahiptir. Kitoooligosakkaritler gıda ve tarım sektöründe büyük önem taşır ancak kitoooligosakkaritlerin en önemli uygulanmaları insan sağlığı ile ilgili medikal söktörün hizmetindedir. Kitoooligosakkaritlerin tümör büyümesini önleme, astım tedavisi, kemik sağlamlığını artırma, sıtmayı önleme ve gen tedavisinde genleri iletmek için vektör olarak kullanılabildiği çeşitli çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (Wang et al., 2015). Kitoooligosakkaritlerin biyolojik aktiviteleri antibakteriyel, antifungal, antiviral, anti-tümör ve antioksidan, immün regülatör etkiler ile yağ yakımı, kan basıncı kontrolü ve hipokolesteromik etkileri içermektedir (Kim and Rajapakse, 2005; Prashanth and Tharanathan, 2007). Daha küçük kitoooligosakkaritler ile karşılaştırıldığında, hekzamerden daha uzun olan kitoooligosakkaritlerin antimikrobiyal, anti-tümör ve immünopotansiyalizasyon (bağışıklık reaksiyonunun hızlandırılması, güçlendirilmesi) da dahil olmak üzere daha fazla biyoaktiviteye sahip olduğu açıklanmıştır. Birçok çalışmada kitoooligosakkaritlerin bir dizi biyolojik aktivitesi tespit edilmesine rağmen bu biyoaktivitelerin arkasındaki moleküler mekanizmalar hakkında çok az bilgi mevcuttur. Ulaşılabilen çok sayıda literatür ışığında kitoooligosakkaritlerin moleküler mekanizmaları ile birlikte biyolojik aktiviteleri bu bölümde anlatılmıştır.

2.8.1 Antimikrobiyal aktivite

Allan ve Hadwiger'in 1979'da kitosan ve türevlerinin geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivitelerinin varlığını ilk kez bildirmelerinden sonra, kitosan ve kitoooligosakkaritler özellikle antimikrobiyal aktiviteleri ile önemli bir üne kavuşmuştur (Allan and Hadwiger, 1979). Günümüze kadar birçok çalışmada, çeşitli bakteri ve fungus türlerine karşı kitoooligosakkaritlerin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri bildirilmiştir. Çeşitli mikroorganizmalara karşı

kitoooligosakkaritlerin antimikrobiyal aktiviteleri, kullanılan kitoooligosakkaritlerin sahip olduğu biyolojik aktiviteleri ile birlikte Çizelge 2.1'de açıklanmıştır.

Çizelge 2.1. Farklı kitoooligosakkarit ürünlerinin antimikrobiyal aktiviteleri.

Kitoooligosakkarit	Biyolojik aktivite	Referans
Kitoooligosakkarit MW 2–30 kDa, DD % 91,5)	Antibakteriyel (<i>Streptococcus mutans</i> ve <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>)	(Choi et al., 2001)
Glisidil trimetilamonyum klorid (GTMAC) ile kitoooligosakkarit	Antibakteriyel (<i>Streptococcus mutans</i>)	(Kim et al., 2003)
Kitoooligosakkarit (MW <5, <3kDa, DD % 80–85)	Antibakteriyel (<i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i>)	(Fernandes et al., 2008)
Kitoooligosakkarit (DP 2–12)	Antifungal (<i>Alternaria alternate</i> , <i>Rhizopus stolonifera</i>)	(Oliveira et al., 2008)
Kitoooligosakkarit (MW <5, <3 kDa, DD % 80–85)	Antibakteriyel (<i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145, <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 155, <i>Candida albicans</i> ATCC 18804)	(Fernandes et al., 2010)
Sülfatlı kitoooligosakkarit (MW 3–5 kDa)	Antiviral (HIV-1)	(Artan et al., 2010)
Kitin, kitosan ve oligomerleri	Antibakteriyel (<i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. aureus</i> ATCC 43300, <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Bacillus cereus</i> , <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. Aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Prevotella melaninogenica</i> ve <i>Bacteroides fragilis</i>)	(Benhabiles et al., 2012)
Kitoooligosakkarit (DP 23, 40)	Antifungal (<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Mucor piriformis</i>)	(Rahman et al., 2015)
Kitoooligosakkarit (DP 4–11, MW 1.7 KDa)	Antifungal (<i>Trichophyton rubrum</i>)	(Mei et al., 2015)
Çeşitli MW ve DA'nın kitoooligosakkarit	Antibakteriyel (<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Eubacterium rectale/Clostridium coccoides</i> , <i>C. histolyticum</i> , <i>Bacteroides/Prevotella</i>)	(Mateos-Aparicio et al., 2016)
Kitoooligosakkarit (MW 30–10 kDa, 10–5 kDa, <5 kDa)	Antibakteriyel (<i>E. coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>)	(Sánchez et al., 2017)
Kitoooligosakkarit (MW 5,1, 14,3, 41,1 kDa)	Antibakteriyel (<i>E. coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , ve <i>Salmonella enteritidis</i>)	(Laokuldilok et al., 2017)

Kitoooligosakkaritlerin antimikrobiyal potansiyeli üzerine yapılan çalışmaların sonuçları arasında pek çok çelişki bulunmaktadır. Bu çelişkilerin nedeni, analiz edilen kitoooligosakkaritlerin kalite, saflık ve özelliklerinin yanı sıra farklı mikroorganizmaların ve çalışma yöntemlerinin kullanılmasının olabileceği düşünülmektedir. Birçok çalışmada, kullanılan kitoooligosakkaritlerin özellikleri zayıf bulunmuştur. Aynı zamanda moleküler ağırlık ve COS ürünlerinin gerçek kompozisyonları, biyolojik aktivitelerinin sonuçları hakkında şüphe ve belirsizliklere yol açacak şekilde tam olarak bilinmemektedir. İyi karakterize

edilmiş kitooligosakkaritler açıkça tanımlanmış polimerizasyon derecesi ve N-asetilasyon derecesi (DA) ile mevcuttur, ancak bunlar hala farklı PA'lı moleküllerin bir karışımıdır. İyi karakterize edilmiş kitooligosakkaritlerin kullanımı için, antimikrobiyal potansiyellerinin tam olarak tanımlanması tıbbi, tarım ve gıda uygulamalarında kitooligosakkaritlerin antimikrobiyal madde olarak kullanılabilirliğini desteklemek için yararlı olacaktır. Bu nedenle iyi tanımlanmış kitooligosakkarit ürünlerini kullanan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar son zamanlarda önem kazanmıştır. Bu çalışmaların sonuçları kitooligosakkaritlerin biyolojik aktivitelerini belirlemek için dikkat çekicidir ve ayrıca kitooligosakkaritlerin çok çeşitli uygulamalarını tanımlamaya yardımcı olabilecektir.

Bakteri, fungus ve mayaların yanı sıra, kitooligosakkaritlerin antiviral faaliyetleri de mevcuttur ve anti-HIV ajanları olarak kullanılabilir. Özellikle, 3-5 kDa moleküler ağırlığa sahip olan sülfatlanmış kitooligosakkarit, HIV-1 virüsünün çoğalmasını durdurmak için en etkili bileşik olarak tespit edilmiştir (Artan et al., 2010). Buna ek olarak, tütün mozaik virüsüne (TMV) karşı da kitooligosakkaritlerin antiviral aktivitesi bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada TMV ile kitooligosakkarit tütün yapraklarına inoküle edildiğinde kitooligosakkaritlerin hastalık kontrol etkisi saptanmıştır (Yin et al., 2010).

Kitooligosakkaritlerin antimikrobiyal aktiviteleri için moleküler mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte, kitooligosakkaritlerin yapısındaki primer amino grupların antimikrobiyal yeteneklerinden sorumlu oldukları düşünülmektedir. Kitooligosakkaritler, hücre bütünlüğünün korunması ve maddelerin çevreden hücrenin içine girmesini kontrol eden hayati bir yapı olan hücre zarının geçirgenliğini değiştirerek mikrobiyal hücrenin ölümüne neden olmaktadır (Choi et al., 2001; Mei et al., 2015). Pozitif yüklü kitooligosakkaritler, mikrobiyal hücre içinde bulunan makromoleküllerin negatif yüklü bileşenleri yoluyla yabancı mikroorganizmaların hücre duvarına bağlanarak içine girebilir. Bu absorpsiyon, kitooligosakkaritlerin DNA'ya nüfuz etmelerine ve RNA transkripsiyonunun bloke edilmesine yol açmaktadır (Kim et al., 2003; Mei et al., 2015).

2.8.2 Antioksidan aktivite

Serbest radikal temizleme aktivitesine sahip olan diğer karbonhidratlar gibi, kitosan ve türevlerinin de oksidatif hasarı önlemek için radikal zincir reaksiyonlarını keserek serbest radikal giderme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Kitoooligosakkarit ve türevleri, kitosan ile karşılaştırıldığında daha güçlü antioksidan aktivitelere sahiptir (Zhao et al., 2013). Çizelge 2.2'de listelenen çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile kitoooligosakkaritlerin antioksidan potansiyeli doğrulanmıştır.

Çizelge 2.2. Farklı kitoooligosakkarit ürünlerinin antioksidan aktiviteleri.

Kitoooligosakkarit	Biyolojik aktivite	Referans
Karboksillenmiş kitoooligosakkarit	Antioksidan	(Rajapakse et al., 2007)
Kitosan oligomer (DA %78-91)	Antioksidan	(Dos Santos et al., 2008)
NA-COS (229,21-593,12 Da)	Antioksidan (RAW 264.7 ve HL-60 hücreleri)	(Ngo et al., 2008)
Kitoooligosakkarit (DP 2-6)	Antioksidan (insan umbilikal ven endotel hücreleri)	(Liu et al., 2009)
NA-COS (1-3, <1 kDa)	Antioksidan (RAW 264.7)	(Ngo et al., 2009)
LMWC (2,8 kDa-87,7 kDa)	Antioksidan (insan serum albumini)	(Tomida et al., 2009)
Kitoooligosakkarit (DP 2-8)	Antioksidan (insan embriyonik hepatositleri)	(Xu et al., 2010)
Kitoooligosakkarit (<1, 1-5, 5-10 kDa)	Antioksidan (Chang karaciğer hücreleri)	(Senevirathne et al., 2011)
Gallik asit konjuge kitoooligosakkarit	Antioksidan (insan kondrosarkom hücreleri)	(Ngo et al., 2011)
Sülfatlı kitoooligosakkarit	Antioksidan (pankreatik β hücreleri MIN6 hücre hattı)	(Lu et al., 2012)
Fenolik asit konjuge edilmiş kitoooligosakkarit	Antioksidan (<i>in vitro</i> modeller)	(Eom et al., 2012)
Kitoooligosakkarit (DP 2-12)	Antioksidan	(Li et al., 2012)
Kitoooligosakkarit (5kDa)	Antioksidan	(Mengibar et al., 2013)
4-hydroxybenzyl-kitoooligosakkarit	Antioksidan (Chang karaciğer hücreleri)	(Trinh et al., 2014)
Kitoooligosakkarit (DD ≥ %95, MW <1 kDa)	Antioksidan ve hepatoprotektif (insan L02 normal karaciğer hücreleri)	(Luo et al., 2014)
Kitoooligosakkarit (DP 2-5, MW 1.5 kDa)	Antioksidan (yüksek yağlı diyet fare modeli)	(Qu and Han, 2016)
Kitoooligosakkarit (2 or 3kDa)	Antioksidan birada	(Yang et al., 2016)
Galik asit konjuge kitoooligosakkarit	Antioksidan (insan akciğer epitelyal A549 hücreleri)	(Vo et al., 2017)
Kitoooligosakkarit (MW 5,1, 14,3, 41,1 kDa)	Antioksidan	(Laokuldilok et al., 2017)

Kitoooligosakkaritin radikal temizleme aktivitesi için moleküler mekanizma açıkça bilinmemekle birlikte, amino gruplarının kararsız serbest radikallerle reaksiyona girerek kararlı radikaller oluşturduğu düşünülmektedir. Antioksidan

aktiviteleri aynı zamanda kitooligosakkaritlerin deasetilasyon derecesi (DD) ve moleküler ağırlığına bağlıdır ve birçok çalışmada, moleküler ağırlığındaki azalma ile kitooligosakkaritlerin antioksidan aktivitelerinin arttığı bildirilmektedir (Park et al., 2004; Tomida et al., 2009; Huang et al., 2012; Zhao et al., 2013). Trimerden daha uzun olan kitooligosakkaritler, iyi bir antioksidan aktivite gösterirken polimerizasyon derecesi (DP) 10-12 olan kitooligosakkaritler en iyi aktiviteyi sergilemiştir (Li et al., 2012).

2.8.3 Antienflamatuvar aktivite

İnflamasyon, fiziksel farklılıklar, mikrobiyal invazyon, ultraviyole ışınları ve bağışıklık tepkileri gibi farklı uyarılara konakçının önemli bir cevabıdır. Aşırı ve uzun süreli inflamasyon, kronik astım, romatizmal artrit, multipl skleroz, inflamatuvar bağırsak hastalığı, sedef hastalığı ve kanser gibi çeşitli hastalıklar şeklinde zararlı etkilere neden olabilmektedir (Ngo et al., 2015). Kitooligosakkaritlerin anti-inflamatuvar aktiviteleri sıkça bildirilmiş ve anti-inflamatuvar potansiyeli bildiren çeşitli yeni araştırmalar Çizelge 2.3'te verilmiştir.

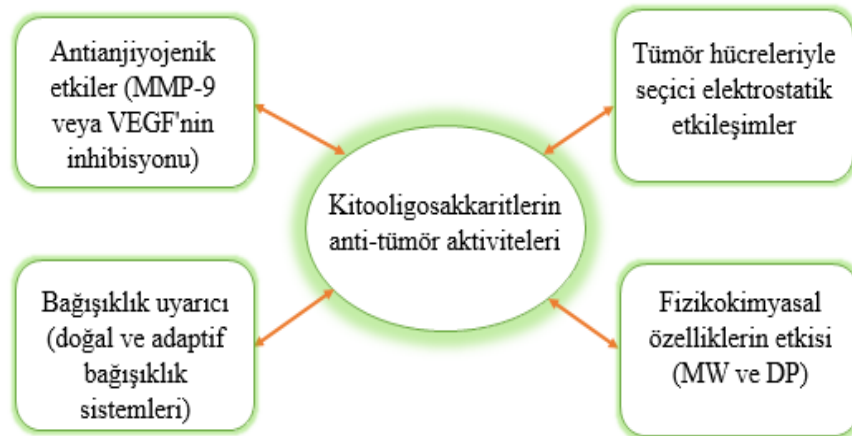
Çizelge 2.3. Farklı kitooligosakkaritlerin anti-inflamatuvar aktiviteleri.

Kitooligosakkarit	Biyolojik aktivite	Referans
Kitooligosakkarit (5-10 kDa, DD %90)	Antienflamatuvar (RAW264.7 makrofaj hücreleri)	(Lee et al., 2009)
Kitooligosakkarit (DP 2-6, DD 95%)	Antienflamatuvar	(Qiao et al., 2011)
Kitooligosakkarit (1-3 kDa, 3-5 kDa, 5-10 kDa)	Anti-alerjik ve antienflamatuvar (RBL-2H3 mast hücreleri)	(Vo et al., 2011)
Kitooligosakkarit (< 1 kDa)	Antienflamatuvar (sıçan basofilik lösemi RBL-2H3 hücreleri)	(Chung et al., 2012)
Kitooligosakkarit (5-10 kDa)	Antienflamatuvar (insan bağırsak epiteline benzer Caco-2 hücreleri)	(Bahar et al., 2012)
Kitooligosakkarit (5-10 kDa, DD >90%)	Antienflamatuvar (fare)	(Yousef et al., 2012)
Kitin-oligomerleri (<1, 1-3 kDa)	Antienflamatuvar (BV-2 mikrogliya hücreleri)	(Vo et al., 2012)
Kitooligosakkarit (≤1 kDa, DD %95)	Antienflamatuvar (endotel hücreleri ve fare modeli)	(Li et al., 2014)
Kitooligosakkarit (DP 2-8)	Antienflamatuvar (inflamatuvar bağırsak hastalığının deneysel modeli olan fare)	(Azuma et al., 2015)
Kitooligosakkarit (DP 3-9)	Antienflamatuvar	(Liang et al., 2016)
Gallik asit konjüge kitooligosakkarit	Antienflamatuvar (insan akciğer epitelyal A549 hücreleri)	(Vo et al., 2017b)
deasetilatlı kitooligosakkarit (DP 2-4)	Nöroprotektif (insan SH-S5Y5 nöronları) ve antienflamatuvar (RAW makrofajlar)	(Santos-Moriano et al., 2017)

Kitooligosakkaritlerin antienflamatuvar aktiviteleri doğrudan fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Yakın tarihli bir araştırmada, enzimatik yöntemle sentezlenen kitooligosakkaritlerin antioksidan ve anti-inflamatuvar aktivitelerinin polimerizasyon derecesine (DP) bağlı olduğu ve düşük DP'ye sahip kitooligosakkaritlerin daha yüksek biyolojik aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Liang et al., 2016).

2.8.4 Anti-tümör / anti-kanser aktivitesi

Kanser, dünyadaki en yaygın hastalıklardan biridir. Bu nedenle, yeni etki tarzlarına sahip yeni nesil anti kanser ajanlarının keşfedilmesi ve geliştirilmesi çok önem kazanmıştır (Shariatikia et al., 2017). Kitooligosakkaritler anti-tümör aktiviteleri nedeniyle potansiyel antikanser ajanlar olarak öne sürülmektedir. Kitooligosakkaritlerin anti-tümör aktiviteleri için mekanizmalar oldukça belirsizdir, ancak, geçmiş çalışmalara dayanarak birkaç mekanizmadan söz edilebilir. Kitooligosakkaritler, katyonik yüklü doğal polisakkaritlerdir ve tümör hücrelerinin geçirgenliğini değiştirerek elektrostatik etkileşim yardımı ile tümör hücrelerini küçültebilmektedirler. Alternatif olarak, normal hücreler kitooligosakkarite benzer pozitif yüklere sahiptir ve bu da kitooligosakkarit ile normal hücreler arasında karşılıklı itmelere neden olmaktadır (Huang et al., 2006). Kitooligosakkaritlerin anti-tümör aktivitesinde rol alan veya bunlara etki eden olası mekanizmalar Şekil 2.5'te gösterilmektedir. Kitooligosakkaritlerin anti-tümör aktivitelerini rapor eden çeşitli çalışmalar ise Çizelge 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.5. Kitooligosakkaritlerin anti-tümör aktivitelerinden sorumlu potansiyel faktörler.

Çizelge 2.4. Farklı kitooligosakkaritlerin ürünlerinin anti-kanser aktiviteleri.

Kitooligosakkarit	Biyolojik aktivite	Referans
Kitooligosakkarit (pentamer, heksamer ve daha yüksek)	Anjiyojenik ve anti-tümör	(Prashanth and Tharanathan, 2005)
Kitooligosakkarit (DA %24, 92)	Kansere karşı anti-kanser hücre hattı HeLa, Hep3B ve SW480	(Huang et al., 2006)
Kitooligosakkarit (1-3 kDa)	İnsan fibrosarkom hücrelerinde matris metalloproteinaz-9'un inhibisyonu	(Van et al., 2006)
NA-COS	İnsan umbilikal ven endotel hücrelerine karşı antianjiyojenik aktivite	(Wang et al., 2007)
Kitooligosakkarit (DP 2–18)	Tavuk korioallantoik membranda antianjiyojenik ve hepatom kanseri stimülasyonu	(Wu and Tsai, 2007)
Kitooligosakkarit (DP >3 and <8)	Anti-tümör ve antimetastatik (insan hepatoselüler karsinom hücre çoğalmasının inhibisyonu)	(Shen et al., 2009)
Kitooligosakkarit (DP 6)	Tümör anjiyogenezi	(Xiong et al., 2009)
Kitooligosakkarit (DP 2-8)	<i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> antiangiogenic aktivite	(Wu et al., 2010)
Kitooligosakkarit (FA 0.15, 0.3, 0.6, DP ≤12)	Koryoallantoik membranda antianjiyojenik ve insan endotel hücrelerinin migrasyonunun inhibisyonu	(Wu et al., 2012)
Amino türetilmiş kitooligosakkarit	Antikanser	(Karagozlu et al., 2012; Karagozlu et al., 2010)
Kitooligosakkarit (DP 2-8)	Prostat kanseri hücrelerine karşı anti-tümör	(Park et al., 2011)
Kitooligosakkarit ve N-asetil-D-glukozamin	Antikanser	(Xu et al., 2012)
Kitooligosakkarit	İnsan akciğer kanseri hattı HepG2 üzerinde anti-çoğalma ve radyosensitizasyon etkisi	(Han et al., 2015)
Kitooligosakkarit (1.0 mg mL ⁻¹ konsantrasyon)	İnsan mide kanseri hücre hatlarının (BGC823, MKN45, SGC7901) anti-çoğalması ve radyosensitizasyon	(Luo et al., 2016)
Gallik asit graftlı kitooligosakkarit	Antibakter (AGS insan gastrik kanseri hücreleri)	(Ryu et al., 2017)

2.8.5 İmmunostimülatör aktiviteler

Bağışıklık sistemi vücuttan yabancı patojenik maddelerin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bağışıklık fonksiyonunun güçlendirilmesi için bağışıklık uyarıcı ilaçlar ve nutrasötikler özellikle önemlidir. Çizelge 2.5'te gösterildiği gibi, çeşitli çalışmalarda, kitooligosakkaritlerin immünostimülatör ajan olma potansiyeli ve immüno-modülasyona bağlı anti kanser tedavileri için kullanımı ortaya konulmuştur. Kitooligosakkaritlerin bu immünostimülasyon aktivitesini makrofaj yüzeyindeki membran reseptörleri ile etkileşime girerek uyguladığı ve makrofajlar üzerindeki kitooligosakkaritlerin immünostimülasyon etkisinin toll benzeri reseptör 4'e bağımlı olduğu düşünülmektedir (Zhang et al., 2014). Kitooligosakkaritlerin makrofajlar üzerindeki kemotaktik etkileri ile makrofaj göçünü etkilediği ve arttırdığı

bulunmuştur (Okamoto et al., 2003). Kitoooligosakkarit tarafından sitokinlerin gen transkripsiyonunun ve protein salınımının teşvik edilmesi bağışıklığın iyileştirilmesi için moleküler mekanizmalar sınırlıdır (Wei et al., 2009).

Çizelge 2.5. Farklı kitoooligosakkarit ürünlerinin immünoestimülasyon aktiviteleri.

Kitoooligosakkarit	Biyolojik aktivite	Referans
Kitoooligosakkarit (3,5 kDa)	İmmünoestimülatör ve anti-inflamatuar (oral alındıktan sonra yaşlı erişkinlerde serum sitokin düzeyleri ile test edilmiştir)	(Kim et al., 2006)
Kitoooligosakkarit LMWC (20 kDa) ve interferon- γ ile kombinasyon halinde kitoooligosakkarit (DP 1-6) karışım	İmmünoestimülatör ve antimikrobiyal (RAW264.7 makrofajlar)	(Moon et al., 2007) (Wu & Tsai, 2007)
Kitoooligosakkarit (5-10 kDa)	İmmünoestimülatör (insan bağırsak epiteline benzer Caco-2 hücreleri)	(Bahar et al., 2012)
Kitoooligosakkarit (DP 4-11)	Farelerde siklofosfamid (Cy) ile indüklenen immüno-supresyona karşı immünoestimülatör	(Mei et al., 2013)
Kitoooligosakkarit (DP 3-8)	İmmünoestimülasyon (makrofajlar üzerinde TLR4 aktive eden farelerde oral uygulama)	(Zhang et al., 2014)
Kitoooligosakkarit (3 ve 50 kDa)	İmmünoestimülatör (RAW264.7 makrofajlar)	(Wu et al., 2015)
Kitoooligosakkarit (3 kDa)	İmmünoestimülatör (RAW264.7 makrofajlar)	(Zheng et al., 2016)
Farklı yöntemlerle üretilen kitoooligosakkarit	<i>In vitro</i> ve <i>in vivo</i> immünomodülatör aktiviteleri	(Xing et al., 2017)

2.8.6 Yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu özellikleri

Yara iyileşmesinde kitin ve kitosanın rolünün, iyileşme sürecinde önemli görevleri olan makrofajların daha fazla üretimi ve sitokinlerin salgılanması da dahil olmak üzere immünoestimülasyon faaliyetleriyle bağlantılı olduğu bulunmuştur (Okamoto et al., 2003). Yüksek miktarda deasetilatlanmış kitosanların fibroblast üretimini uyarabildiği ve yara iyileştirme sürecini artırabildiği tespit edilmiştir (Howling et al., 2001). Kitin, NA-COS ve NA-D-glukozamin ile kıyaslandığında kitoooligosakkaritler, D-glukosamin ve yüksek deasetilasyon derecesiyle kitosan, oluşturulan yara modelinde daha yüksek kopma direnci ve daha yüksek fibroblast aktivasyonu sergilemektedir (Minagawa et al., 2007). Kitoooligosakkaritlerin yara iyileştirme potansiyelinin, fibroblast büyüme faktörünü düzenleyerek fibroblast üretimini uyarabilme yeteneğinin bir sonucu olduğu öne sürülmüştür. Sonuçta artan kollajen üretimi, bağ dokularının

gelişimine daha fazla yardımcı olmaktadır. Yapılan bir araştırmada, poliüretan membran modifikasyonunda kitooligosakkaritlerin duyarlılığı bildirilmiştir. Kitooligosakkarit kullanılarak modifiye edilmiş membranlar, nemi muhafaza etmede, yara iyileşmesini hızlandırmada ve yara pansumanlarında en önemli faktörlerden biri olan antibakteriyel aktiviteyi sağlamada önemli derecede faydalı bulunmuştur. Yürütülen çalışmalar, yara sargısı materyali olarak çeşitli uygulamalarda kitooligosakkaritlerin önemini ortaya koymaktadır (Luo et al., 2017).

2.8.7 Hipokolesterolemik etki

Kitooligosakkaritlerin diğer biyolojik aktiviteleri gibi hipokolesterolemik etkileri ve yağ bağlama yetenekleri de fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Ancak fizikokimyasal özellikleri ile hipokolesterolemik etki arasında henüz bir ilişki kurulamamıştır. Bu konuda yapılan çalışmalarda, yüksek polimerizasyon derecesine (DP) sahip kitooligosakkaritlerin farelerde belirgin hipokolesterolemik etkiler sergilediği tespit edilmiştir. Ayrıca düşük moleküler ağırlıklı kitooligosakkaritlerin plazma ve karaciğerdeki lipoprotein lipaz aktivitelerini artırmak için daha etkili olduğu görülmüştür (Zhang et al., 2012b).

2.8.8 Bitki Elisitörleri

Elitisörler bitkilerin savunma mekanizmasını harekete geçiren spesifik moleküllerdir (Day et al., 2003). Patojen mikroorganizmalara karşı yüksek bitkilerin savunma tepkileri genellikle fitoaleksinler, proteinaz inhibitörleri ve hidrolazların sentezi şeklindedir (McDowell and Dangel, 2000). Kitooligosakkaritlerin bitki savunma sistemi konusunda araştırma yapan bilim insanları için büyük bir potansiyele sahip oldukları bildirilmiştir. Birçok çalışmada bitki savunma mekanizmasının aktivasyonu için kitooligosakkaritlerin olumlu etkileri bildirilmiştir (Day et al., 2003; de Jonge et al., 2010; Liu et al., 2012).

2.8.9 Gıda katkı maddeleri olarak kitooligosakkaritler

Kitosan birçok gıda uygulamasında önemli role sahiptir. Ancak kitooligosakkaritlerin öne çıkan avantajları onları gıda endüstrisinde kitosandan üstün kılmaktadır. Kitooligosakkaritlerin antimikrobiyal, antioksidan ve immünostimülatör özellikleri gıda uygulamalarındaki önemini daha da artırmaktadır. Çeşitli gıdalarda kitooligosakkaritlerin kullanımı, sadece gıdanın kalitesini koruyarak raf ömrünü uzatmakla kalmaz, aynı zamanda fonksiyonel gıda maddesi ve nutrasötik olarak da görev yapabilmektedir. Gıda endüstrisinde kitooligosakkaritlerin öne çıkan bazı uygulamaları bu bölümde güncel çalışmalar ışığında özetlenmiştir.

2.8.9.1 Gıda koruyucusu

Kitooligosakkaritlerin çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı önleyici etkileri, katkı maddesi olarak sadece fonksiyonel gıda olarak değil aynı zamanda koruyucu ve ambalaj malzemesi olarak kullanılmasını teşvik etmektedir. Yapılan bir çalışmada, kitosan filmlere kitooligosakkaritlerin ilavesinin, filmin su buharı geçirgenliğini değiştirmeden çeşitli bakteri türlerine (*E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Serratia liquefaciens* ve *Lactobacillus plantarum*) karşı antimikrobiyal aktivite sağladığı bildirmiştir (Fernandez- de Castro et al., 2016). Kitooligosakkaritler bu türlü antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle gıda ambalaj filmlerine dahil edilebilmeleri için büyük potansiyele sahiptir. Gram negatif bakterilere karşı kitooligosakkarit ve lizozim kombinasyonu kullanıldığında ise antimikrobiyal aktivitenin sinerjistik etkileri gözlenmiştir. Bu iki antimikrobiyal ajanın antimikrobiyal spektrumu birlikte kullanıldığında *E. coli*, *P. fluorescens* ve *B. cereus*'un tamamen ortadan kaldırılması ve ürün paketlenme ve saklama çalışmalarında *S. aureus* yükünün azaltılmasını sağlamıştır. Ayrıca, soğuk zincirde, kitooligosakkarit ve lizozim karışımı eklenen kıymada raf ömrünün 15 güne kadar uzadığı tespit edilmiştir (Rao et al., 2008).

2.8.9.2 Bağışıklık uyarıcı

Kitooligosakkaritler yaşla ve diyetle ilgili hastalıkları önleyebilecek fonksiyonel gıdaların üretimi için bir bileşen olarak kullanılabilir (Nurhayati and

Tang, 2016). Kitoooligosakkaritler canlı dokulara doğal olarak biyolojik uyumlu olduğu, toksik ve alerjenik olmadığından bir ilaç adayı ve gıda katkı maddesi olarak umut vericidir. Bazı gıda sınıfı oligosakkaritlerin konakçı dokuyu patojen bulaşmasından koruyabileceği bildirilmiştir. Kitoooligosakkaritlerin bu etkisi aynı konsantrasyonlarda kullanıldığında diğer oligosakkaritlerden daha fazla bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada enteropatojenik *E. coli*'nin insan epitel hücre hattına yapışmasının kitoooligosakkaritler tarafından engellendiği bildirilmiştir (Quintero-Villegas et al., 2013).

2.8.9.3 Prebiyotik

Tüm dünyada işlevsel gıda bileşenleri, nutrasötikler ve diyet takviyelerinin araştırılması, geliştirilmesi ve ticaretine yönelik ilgi artmaktadır (Nurhayati et al., 2016). Sindirilmemesi ve probiyotik bakteriler üzerindeki yararlı etkileri yanında bağırsak patojenlerinde önleyici etkileri olan kitoooligosakkaritlerin prebiyotik olarak geliştirilmesi için büyük bir potansiyele sahiptir. Daha önce DP 2-8, MW <1,5 kDa ve DD % 99,9 ile kitoooligosakkaritlerin prebiyotik potansiyeli bildirilmiş ve *Bifidobakteri* ve *Lactobacillus*'un büyümesini teşvik ettiği keşfedilmiştir (Lee et al., 2002). Hayvanlarda kitoooligosakkaritlerin besinsel önemi daha önce kanıtlanmış olup, kitoooligosakkaritlerin etkili bir yem katkı maddesi olduğu belirtilmiştir. Domuzların büyüme performansı üzerine kitoooligosakkarit takviyesi etkisi, dışkıda *Laktobacillus* sayısının arttığını, buna karşılık *E. coli* sayısının, kitoooligosakkarit 200 mg kg⁻¹ seviyesinde kullanıldığında düştüğünü göstermiştir (Liu et al., 2008).

2.9 Ticari Kitoooligosakkarit Ürünleri

Günümüzde kitoooligosakkaritler birkaç firma tarafından üretilmekte ve satışı yapılmaktadır (Çizelge 2.6). Bu ürünler, iyi tanımlanmış saflıklara sahip kısmen karakterize edilmiş kitoooligosakkaritlerden oluşmaktadır. Kitoooligosakkarit içeren ticari ürünler günümüzde uluslararası düzenleyici kurumlar tarafından kabul görmemesine karşın, daha önce kitosan polimerini içeren birkaç ürün, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA tarafından güvenli diyet takviyeleri veya yeni nesil

gıda maddeleri olarak kabul edilmiştir. Genellikle güvenilir kabul edilen (GRAS) uyarısında gıda işlemede kullanılan ikincil bir gıda katkı maddesi kitosan olan KiOfine®-B'nin insanlar ve hayvanlar için kitosan oligomerleri (<1 kDa, deasetilasyon derecesi %70-95) olarak yüksek diyet konsantrasyonlarında tüketilebileceği vurgulanmıştır. Sağlıklı erişkinlerin bağışıklık fonksiyonu üzerine oral yoldan verilen kitooligosakkarit (FACOS™, 3,5 kDa) etkinliğine ilişkin bir klinik araştırma da 2007'de tamamlanmıştır (Gurovic et al., 2015).

Çizelge 2.6. Kitooligosakkaritlerin ticari üretimi.

Üretici Firma	Ülke	Ürün adı	Uygulamalar
Megazyme	İrlanda	Kitooligosakkaritler	Araştırma, biyokimyasal enzim deneyleri ve analitik uygulamalar
Amsbio	Birleşik Krallık	N-Acetyl kitooligosakkaritleri	Analitik uygulamalar
Omicron Biochemicals, Inc.	ABD	N-asetilglukozamin oligomerler (kito-oligosakkaritler)	Analitik uygulamalar
Bioland	Kore	Kitooligosakkaritler	Kan kolesterolünün iyileştirilmesi
Kitto life marine biotechnology	Kore	Kitooligosakkaritler FACOS PRIME ve CHITO PEP® Kitooligosakkaritler	Kolesterol seviyesini, bağışıklık sistemi fonksiyonunu, normal hücre bölünmesini geliştirme
Beijing Wisapple Biotech Co., Ltd.	Çin	Kitooligosakkaritler	Gıda, ilaç, tarım, endüstriyel ve çevresel uygulamalar
Joint Venture NFW Biological Technology Co., Ltd.	Çin	Gıda sınıfı kitooligosakkaritler	Tıp, gıda, sağlık, biyokimya, kimya ve tarım
Qingdao BZ Oligo Biotech Co., Ltd	Çin	Kitosan oligosakkaritleri (DP 2-20, average MW 3 kDa)	Gıda ve ilaç, yem, tarım, kozmetik.
Xi'an Hygethy Biotechnology Co., Ltd.	Çin	İlaç sınıfı kitosan oligosakkaritleri	Antioksidan ve gıda katkı maddesi
Qingdao Reach International Inc.	Çin	Kitosan oligosakkaritleri	Tarımsal fungusid
Jinan Haidebei Marine Bioengineering Co., Ltd.	Çin	Kitosan oligosakkaritleri	Bağışıklık uyarıcı
Zhejiang Golden-Shell Pharmaceutical Co.	Çin	Kitosan oligosakkaritleri	Gıda sınıfı ve tarım
BioCHOS	Çin	Kitosan oligosakkaritleri	Gıda, kozmetik ve tarım
Chunkisam Co., Ltd.	Norveç	Kitooligosakkaritleri	Tarımsal fungusit
Hubei YuanCheng Saichuang Technology Co., Ltd.	Kore	Kitooligosakkaritleri kapsül (G33CH120)	Anti-obezite
CAN Biotech Co, Ld	Çin	Kitosan oligosakkaritleri	Çoklu biyolojik uygulamalar
	Kore	Kitosan oligosakkaritleri	Çoklu biyolojik uygulamalar

Kitosan, Kore ve Japonya'da bir gıda katkı maddesi olarak onaylanmıştır. Ayrıca ABD’de FDA kitosanı GRAS statüsünü de onaylamıştır böylece, kitosanın gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirliği güvence altına alınmıştır (Kerch, 2015). Karides türevi bir kitosan ChitoClear® da GRAS olarak kabul edilmiştir (GRAS Bildirimi (GRN) No. 443). Kitostanın normal kolesterol seviyesinin korunmasına katkısı, AB tarafından saptanmış olan, gıda için yetkili sağlıklı özellikler listesinde yer almaktadır (432/2012 Sayılı AB Yönetmeliği). Bu kitosan, asetillenmiş kitosandan (DA yaklaşık %38) oluşmaktadır ve normal kolesterol seviyelerinin ve bağırsak mikrobiyolojisinin sürdürülmesini sağlayabileceği öngörülmektedir (Mateos-Aparicio et al., 2016). Bu resmi izin ve onaylar, gıda ve tıbbi uygulamalarda kitooligosakkaritlerin güvenliği ve uygunluğuna dair kanıtlar olduğundan, kitooligosakkarit bazlı ürünlerin ticarileştirilmesi aşamalı olarak hızlanmaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada 2008 yılında tamamlanmış olan “Bağ, Bahçe Toprakları ve Bitki Materyallerinden Kitosanaz Aktivitesine Sahip *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu, TÜBİTAK-TOVAG 104O339” projesi kapsamında çeşitli kaynaklardan izole edilen Ege Üniversitesi, “Biyomühendislik Bölümü *Bacillus* Kültür Koleksiyonu”nda yer alan ve GenBank’a kayıtlı, kitosanaz aktivitesine sahip yerel *Bacillus* suşları kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *Bacillus* suşları ve kodları.

No	İzolat Kodu	Tür adı	GenBank aksesyon numaraları
1	EGE-B-6.1m	<i>Bacillus cereus</i>	KT970378
2	EGE-B-14.1i	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KC119404
3	EGE-B-14.7i	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KC119403
4	EGE-B-19.3	<i>Bacillus mycoides</i>	KT970379
5	EGE-B-28.2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KT970380
6	EGE-B-2.5m	<i>Bacillus cereus</i>	KT970381
7	EGE-B-44.1	<i>Bacillus mycoides</i>	KT970382
8	EGE-B-5.5m	<i>Bacillus cereus</i>	KT970383
9	EGE-B-36.1	<i>Bacillus mycoides</i>	KT970384
10	EGE-B-36.5	<i>Bacillus subtilis</i>	KT970385
11	EGE-B-10.4i	<i>Bacillus cereus</i>	KC119402
12	EGE-B-3.5m	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KT970386
13	EGE-B-4.1i	<i>Bacillus cereus</i>	KC119406
14	EGE-B-4.2i	<i>Bacillus cereus</i>	KC119401
15	EGE-B-5.2i	<i>Bacillus mojavenis</i>	KC119405
16	EGE-B-1.19	<i>Bacillus subtilis</i>	EU099356

3.1.2 Kullanılan besin ortamları, çözeltiler ve kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan tüm besin ortamları 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.1 Nutrient agar ve Nutrient broth

Bacillus izolatlarının üretiminde ve saklanması ticari olarak hazır halde satılan Nutrient Broth (*Oxoid*, CM0001) ve Nutrient Agar (*Oxoid*, CM0003) ortamları kullanılmıştır.

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient agar	28,0 g
Distile su	1000 mL
Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient broth	13,0 g
Distile su	1000 mL

3.1.2.2 Kolloidal kitinin hazırlanması

Koloidal kitin, kitin (Sigma C7170) kullanılarak Hsu ve Lockwood'un modifiye yöntemi ile hazırlanmıştır. Kısacası, 40 g kitin yavaşça 600 mL konsantre HCl'a elave edildi ve 30°C de 60 dakika boyunca kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Kitin 2 L distile suya (4°C'de soğutulan) yavaş yavaş ilave edilerek bir kolloidal süspansiyon olarak çökeltiştir. Bu kolloidal süspansiyon kaba filtre kağıdı ile süzülerek toplanmıştır ve yaklaşık 5 L distile su içinde süspanse edilerek yıkanmıştır. Yıkama süspansiyonun pH değeri 4 oluncaya kadar tekrarlanmıştır.

3.1.2.3 Kitinaz aktivitesinin taranması için kullanılan besin ortamı

Bileşenin Adı	Miktarı (1 L için)
Koloidal kitin	10 g
Maya ekstraktı	0,05 g
KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
NH ₄ Cl	1 g
NaCl	0,5 g
Agar	15 g
pH	7,0

3.1.2.4 Kitinaz üretimi için kullanılan besin ortamı

Bileşenin Adı	Miktarı (1 L için)
Kolloidal kitin	30 g
Maya ekstraktı	0,05 g
K ₂ HPO ₄	0,7 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
NaCl	4 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂	0,01 g
ZnCl ₂	0,01 g
CaCl ₂	0,01 g
pH	7,0

3.1.2.5 Kolloidal kitosanın hazırlanması

Bu yöntemde 5 g kitosan ((Sigma, 448869 düşük moleküler ağırlık 75-85% deasetilatlı) 5ml 1M HCl ve 100 mL distile su içinde yaklaşık 2 saat çözülerek %50 NaOH (w/v) ile çözeltinin pH 6,0 ya getirilmiştir. Bu karışım 8-10 kez distile suyla yıkanmış ve kolloidal süspansiyon kaba filtre kağıdı ile süzülerek toplanmıştır. Kolloidal kitosan otoklavda sterilize edip 4°C'de saklanmıştır (TÜBİTAK-TOVAG 104O339).

3.1.2.6 Kitosanaz aktivitesinin taranması için kullanılan besin ortamı

Bileşenin Adı	Miktarı (1 L için)
Kolloidal kitosan	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,5 g
CaCl ₂	0,1 g
Agar	13 g
pH	6,8

3.1.2.7 Kitosanaz üretimi için kullanılan besin ortamı

Bileşenin Adı	Miktarı (1 L için)
Kolloidal kitosan	5 g
Maya ekstraktı	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,5 g
CaCl ₂	0,1 g
pH	6,8

3.1.2.8 DNS çözeltisi

Bileşenin Adı	Miktarı
Dinitrosalisilik asit	7,5 g
NaOH	14,0 g
K-Na tartarat	216,1 g
Fenol	5,4 mL
Na ₂ S ₂ O ₅	5,9 g
Distile Su	1000 mL

Kitosanaz enziminin aktivite tayininde kullanılan DNS çözeltisinin hazırlanması 7,5 g dinitrosalisilik asit, 14g NaOH, 216,1 g K-Na tartarat, 500 mL distile suda çözülmüş, 5,4 mL fenol eklenerek, çözelti 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Tüm içerikler iyice karıştırılarak çözüldükten sonra filtreden geçirilerek kahverengi şişede saklanmıştır (Miller, 1959).

3.1.2.9 Schale's çözeltisi

Bileşenin Adı	Miktarı
Potasyum ferrisiyadin	0,5 g
Sodyum karbonat	53 g
Distile Su	1000 mL

Kitinaz enziminin aktivite tayininde kullanılan çözeltidir.

3.1.2.10 Bradford Cözeltisi

Protein tayininde ticari olarak satılan Bradford Reagent (Merck, 110306 Protein Kit) kullanılmıştır.

3.1.2.11 Enzim saflaştırmada Kullanılan Çözelti

Amonyum sülfat ile protein çöktürmede katı amonyum sülfat (Sigma, A4418) kullanılmıştır.

Bileşenin Adı	Miktarı
Tris-HCl	1,73 g
Tris	1,09 g
Distile Su	1000 mL

20 mM Tris tamponu, pH 8,0 diyaliz basamağında ve iyon değişim kromatografisinde kullanılmıştır.

3.1.2.12 SDS-PAGE’de Kullanılan Çözeltileri

- %30 ‘luk akrilamid karışımı

Bileşenin Adı	Miktarı
Akrilamid	29 g
Bisakrilamid	1 g
Distile Su	100 mL

Karışım hazırlandıktan sonra Millipore Express™ plus 0,22 µm filtreye filtrelenir ve 4°C'de karanlıkta saklanır.

- 10X SDS-PAGE jel yürütme tamponu (gel running buffer)

Bileşenin Adı	Miktarı
Trizma base	30 g
Glisin	144 g
SDS	10 g
Distile Su	1000 mL

- 4X Ön Ayırma Jeli Tamponu (Stacking gel buffer)

0,5 M Tris-HCl (pH: 6,8), %0,4 SDS

- 4X Ayırma Jeli Tamponu (Separating gel buffer)

1,5 M Tris-Cl (pH: 8,8), %0,4 SDS

- 4X SDS-PAGE jel Laemli Buffer/Yürütme Tamponu (gel loading buffer)

40 mM Tris-HCl (pH: 6,8), 4 mM EDTA, %4 SDS, %20 Gliserol, 200 µl Brom fenol mavisi (10 mL için). Kullanımdan önce %10 β-Merkaptoetanol eklenir.

- Elektroforez Tamponu (10X Tank Buffer, pH 8,4± 0,2)

SDS-Tris-Glycine buffer (10X) BioChemica (A1415,1000) ticari olarak satılan hazır tampon 1/10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

- Boyama solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
Coomassie Brilliant Blue	0,25 g
Methanol	45 mL
Glacial acetic acid	10 mL
Distile Su	45 mL

- Boyayı geri alma solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
Methanol	50 mL
Glacial acetic acid	50 mL
Distile Su	400 mL

- %12 Ayırıcı jelin hazırlanması (10 ml)

Bileşenin Adı	Miktarı
4x ayırma-jel tamponu	2,5 mL
%30 akrilamid karışımı	4 mL
Ultra saf su	3,4 mL
%10 Amonyum persülfat	0,15 mL
TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine)	0,005 mL

- Ön Ayırma (Stacking) jelin hazırlanması (5 ml)

Bileşenin Adı	Miktarı
4x ayırma-jel tamponu	1,25 mL
%30 akrilamid karışımı	0,85 mL
Ultra saf su	2,85 mL
%10 Amonyum persülfat	0,075 mL
TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine)	0,005 mL

3.1.2.13 Süspanse kitin ve kitosanın hazırlanması

%1'lik süspanse kitin hazırlamak için 0,1g kitin 10 mL distile suyun içine ilave edilip iyice karıştırılmıştır. %1'lik süspanse kitosan hazırlamak için 0,1g kitosan 10 mL distile suyun içine ilave edilip iyice karıştırılmıştır.

3.1.2.14 Çözünür kitosanın hazırlanması

%2'lik çözünür kitosan solüsyonu hazırlamak için 2g kitosan 70 mL %1 asetik asit çözeltisi (v/v) içinde çözünmüştür. Kitosanın tamamen çözünmesinden sonra solüsyonun pH değeri 1 M NaOH kullanılarak 5,5'a ayarlanmıştır ve hacim distile su ile 100 mL'ye getirilmiştir.

3.1.2.15 HPLC'de Kullanılan kimyasallar

Sıvı kromatografisi için gradiyent derecesi asetonitril LiChrosolv® Reag. Ph Eur. CAS 75-05-08 (Merck) HPLC'de mobil faz olarak kullanılmıştır.

3.1.3 Kullanılan cihazlar

3.1.3.1 Hassas terazi

Mettler toledo marka (AL204 model) hassas terazi kullanılan besiyeri ve kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.3.2 pH-metre

Sartorius Basic Meter PB-11 marka pH-metre besin ortamı ve diğer karışımların pH değerlerinin ayarlanması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.3 Vorteks

Yellowline marka ve TTS2 model vorteks, homojen karıştırmayı sağlamak için kullanılmıştır.

3.1.3.4 Isıtıcıly manyetik karıştırıcı

Heidolph marka ve MR 3001 model ısıtıcıly manyetik karıştırıcı, kullanılan besin ortamları ve diğer karışımların hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.5 Otoklav

Hirayama marka Hiclave HVE-50 model otoklav besin ortamları ve diğer çözeltilerin sterilizasyonun sağlanması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.6 İnkübatör

Nüve ES 110 (Türkiye) ve Binder markalı inkübatörler, kültürlerin 30°C’de inkübasyonları için kullanılmıştır.

3.1.3.7 Çalkalamalı inkübatör

Infors Multitron marka çalkalamalı inkübatör, 30°C’de sıvı kültürde hücrelerin gelişiminin sağlanması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.8 Spektrofotometre

AquaMate Plus UV-Vis 9423AQA2100E spektrofotometre enzim aktivitesi ve protein absorbans değerleri ölçölmekte kullanılmıştır.

3.1.3.9 Pastör fırını

Binder marka Pastör fırını, 180°C’de iki saat çalıştırılarak cam malzemelerin sterilizasyonu için kullanılmıştır.

3.1.3.10 Santrifüj

PrO-Research, K241R Medium Prime Refrigerated santrifüj üretim sonrası üretim ortamından biyokütlenin ayrılması için ve enzim saflaştırmasında protein presipitatlarının toplanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.11 Liyofilizatör

CHRIST-ALPHA (Almanya) marka ve 1-4 LD Plus model liyofilizatör, enzim saflaştırmasında ve kitooligosakkaritlerin üretiminde fraksiyonların dondurarak kurutulması amacıyla kullanılmıştır.

3.1.3.12 Su banyosu

Memmert (Almanya) marka su banyosu, enzimin optimum sıcaklıkılığının belirlenmesi ve termal stabilitesinin belirlenmeside kullanılmıştır.

3.1.3.13 SDS PAGE

SDS PAGE için BioRad, Mini-PROTEAN Tetra Cell (1658001EDU) kullanılmıştır.

3.1.3.14 HPLC sistemi

HPLC analizinde, Thermo Scientific Accela, PDA dedektörü (60057-60050), Accela otomatik örnekleme (60057-60020), Accela HPLC kuaterner pompa (60057-60010) kullanılmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 *Bacillus* suşlarına ait kültürlerin aktifleştirilmesi

“Biyomühendislik Bölümü Kültür Koleksiyonu”nda 4°C’de yatık nutrient agarlı tüplerde muhafaza edilen 16 adet *Bacillus* suşu çalışmanın her aşamasında yatık olarak hazırlanmış nutrient agarlı tüplere inoküle edilerek 30°C’de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir.

3.2.2 *Bacillus* suşlarının kitinaz aktivitelerinin taranması

Bacillus suşlarının kitinaz aktivitelerinin taranması amacıyla besiyerinde karbon kaynağı olarak yalnızca kolloidal kitin kullanılmıştır. Kolloidal kitin içeren katı besiyerinde büyütülen suşların tek karbon kaynağı olarak kitini kullanma yetenekleri, bakterilerin büyümesi ve koloni etrafında kitinin parçalanmasıyla oluşturdukları şeffaf zonla belirlenmiştir. 3.1.2.3’de içerikleri verilmiş olan kolloidal kitin agar besiyeri steril edildikten sonra aseptik koşullarda steril petrilere dökülerek, her bir petrinin merkezine nutrient agar besiyerinde stok olarak saklanan *Bacillus* izolatlarından nokta ekimi yapılmıştır ve 30°C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda bakterileri kolonilerinin etrafında oluşan şeffaf zon izlenmiştir (Kamil et al., 2007).

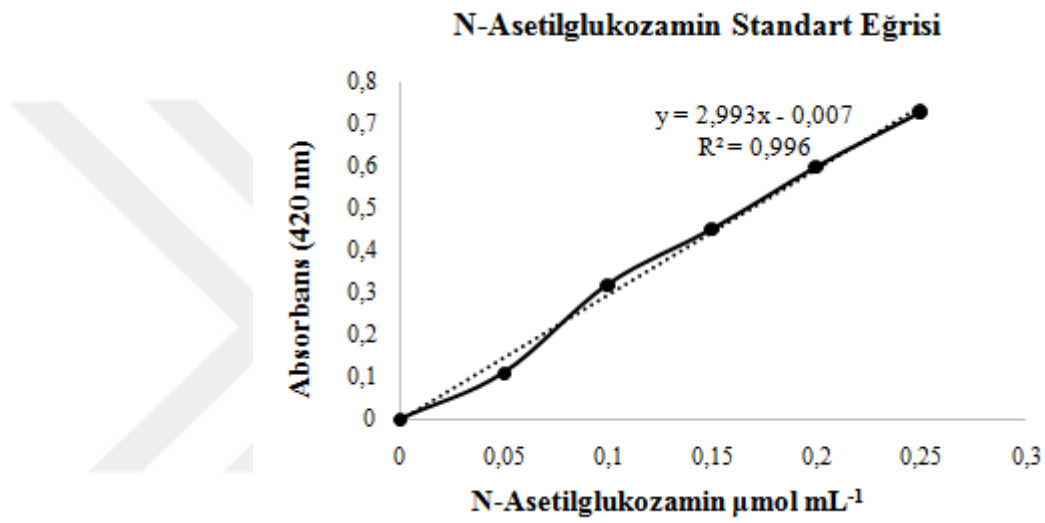
3.2.2.1 *Bacillus* suşlarının kitinaz enzim üretimi

Kitinaz enzim üretimi için *Bacillus* spp.’nin her biri 3.1.2.4’de içerikleri verilmiş olan enzim üretim besiyerinde 5 gün boyunca 30°C’de, 150 rpm’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince üretim ortamından her gün örnek alınarak kitinaz enzim aktivitesi tayin edilmiştir (Woo & Park, 2003).

3.2.2.2 Kitinaz enzim aktivitesi ölçümü

Kitinaz enzim aktivitesinin ölçümü için üretim sonrası kültür sıvısı 15 dakika boyunca 9000 rpm’de santrifüjlenerek süpernatant elde edilmiştir. Kitinaz aktivitesi substrat olarak %1’lik kolloidal kitin ve standart olarak N-Asetilglukozamin (GlcNAc) kullanılarak Schales metodu ile ölçülmüştür (Imoto

& Yagishita, 1971). 0,9 mL %1'lik kolloidal kitin ve 0,1 mL üretim sıvısı 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakılarak, 0,2 mL 1N NaOH ile reaksiyon durdurulmuş ve 1 mL Schales çözeltisi eklenerek 15 dakika kaynatıldıktan sonra 420 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbens değerleri ölçülmüştür. Standart eğri grafiğinden elde edilen formülde, örneklerin absorbens değerleri yerine koyularak enzim aktivite miktarı hesaplanmıştır (Şekil 3.1). Kullanılan yöntemde; bir ünite (U) kitinaz aktivitesi, 1 saatte 1µmol indirgen şeker oluşturmak için gerekli enzim miktarı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.1. Kitinaz enzim aktivitesi için standart eğri grafiği.

3.2.3 *Bacillus* suşlarının kitosanaz aktivitelerinin taranması

Bacillus suşlarının kitosanaz aktivitelerinin taranması amacıyla besiyerinde karbon kaynağı olarak yalnızca kitosan (Sigma, 448869 düşük moleküler ağırlık 75-85% deasetilatlı) kullanılmıştır. Kitosan içeren katı besiyerinde büyütülen suşların tek karbon kaynağı olarak kitosanı kullanma yetenekleri, bakterilerin büyümesi ve koloni etrafında kitosanın parçalanmasıyla oluşturdukları şeffaf zonla belirlenmiştir. Kitosanaz enzim aktivitesinin taranması amacıyla, 3.1.2.6'de verilmiş olan besiyeri hazırlanarak aseptik koşullarda steril petrilere dökülmüş ve tüplerde yatık olarak hazırlanmış nutrient agar besiyerinde aktifleştirilmiş *Bacillus* suşlarının her birinden ayrı ayrı her bir petrinin merkezine nokta ekimi yapılmıştır

ve 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır (Choi et al., 2004). İnkübasyon sonucunda bakterileri kolonilerinin etrafında oluşan şeffaf zon izlenmiştir.

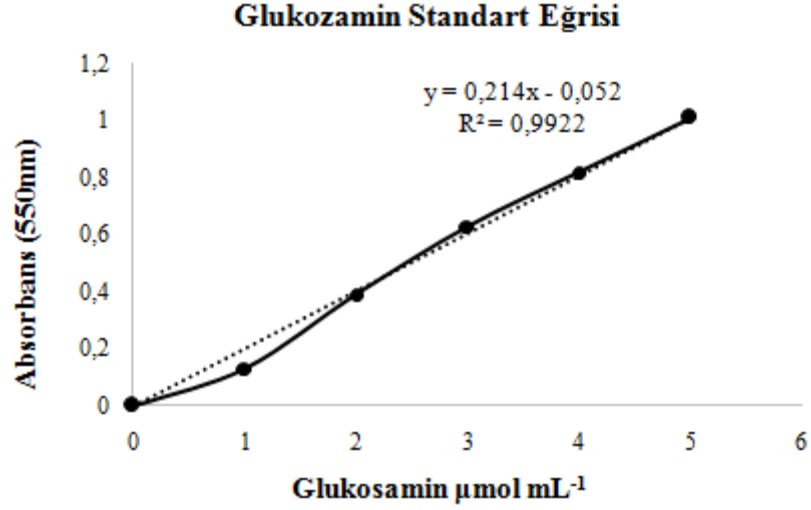
3.2.3.1 *Bacillus* suşlarının kitosanaz enzim üretimi ve ham enzim ekstraktın eldesi

Kitosanaz enzim üretimi için *Bacillus* spp.'nin her biri 3.1.2.7'de verilen besiyerinde 5 gün boyunca 30°C'de, 150 rpm'de inkübe edilmiştir (Sinha et al., 2012). İnkübasyon süresince üretim ortamından her gün örnek alınarak kitosanaz enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Kitosanaz enzim aktivitesinin ölçümü için üretim sonrası ham enzim ekstraktı elde etmek için kültür sıvısı 15 dakika boyunca 9000 rpm'de 4°C'de santrifüjlenerek ham enzim içeren süpernatant elde edilmiştir.

3.2.3.2 Kitosanaz aktivitesi ölçümü

Kitosanaz aktivitesi substrat olarak %1'lik kolloidal kitosan ve standart olarak D-glukozamin kullanılarak DNS (Dinitrosalisilik asit) metodu ile ölçülmüştür (Miller, 1959). 0,9 ml %1'lik kolloidal kitosan (pH 5,5'da 0,2 M sodyum asetat tamponu içinde çözülerek, 30 dakika boyunca inkübe edilerek ön işleme tabi tutulmuştur) ve 0,1 ml üretim sıvısı 10 dakika 50°C'de inkübasyona bırakılarak, 1 ml DNS eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve karışımın kalan kısmında kolloidal kitosanın ayrılması için 5 dakika 9000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Ardından 5 dakika kaynatıldıktan sonra 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbens değerleri ölçülmüştür. Standart eğri grafiğinden elde edilen formülde, örneklerin absorbens değerleri yerine koyularak enzim aktivite miktarı hesaplanmıştır (Şekil 3.2).

Kullanılan yöntemde; bir ünite (U) kitosanaz aktivitesi, 1 saatte 1µmol indirgen şeker oluşturmak için gerekli enzim miktarı olarak kabul edilmiştir. Kitosanaz enzimlerinin aktiviteleri ilerleyen aşamada kısmi saflaştırmanın her basamağında yukarıda açıklanan yöntemlerle tayin edilmiştir.

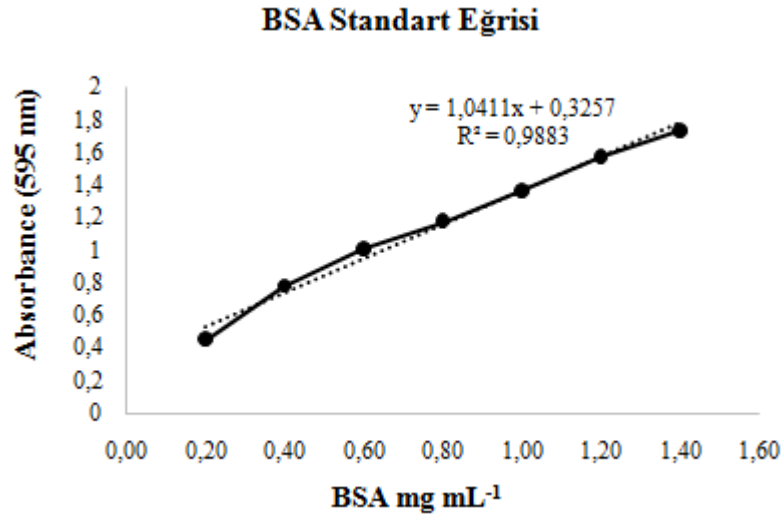


Şekil 3.2. Kitosanaz enzim aktivitesi için standart eğri grafiği.

3.2.3.3 Protein tayini

Enzim üretimlerinde üretim sonrası ve kısmi saflaştırmanın her aşamasından alınan örneklerde Bradford yöntemi ile protein tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ticari olarak hazır olarak satılan Bradford Reagent (Merck, 110306) kullanılmıştır. Bovine Serum Albumine (BSA)'nin farklı konsantrasyonları (0,2-1,6 mg mL⁻¹) standart olarak kullanılmıştır. Spesifik enzim aktivitesi ise aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Spesifik enzim aktivitesi (U mg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Toplam enzim aktivitesi (U)}}{\text{Toplam protein miktarı (mg)}}$$



Şekil 3.3. Protein miktarı standart eğri grafiği.

3.2.4 Kitosanaz üretiminin optimizasyonu

Çalışmada kitosanaz enzim üretiminin optimizasyonu için incelenen suşlardan bir tanesi seçilerek optimizasyonu yapılmıştır.

3.2.4.1 Optimum karbon kaynağının belirlenmesi

Optimum karbon kaynağını seçmek için, kitosanaz üretim ortamına (3.1.2.7) farklı karbon kaynakları ayrı ayrı ilave edilerek denemeler yapılmıştır. Karbon kaynağı olarak süspanse kitosan, koloidal kitosan, çözünür kitosan, süspanse kitin, koloidal kitin, glikoz, laktoz, melas, selüloz ve çözünebilir nişasta 5 g L^{-1} konsantrasyonda kullanılmıştır.

3.2.4.2 Karbon kaynaklarının optimal kombinasyonunun belirlenmesi

En iyi karbon kaynağını seçtikten sonra, kitosanaz üretimini geliştirme fikriyle, çeşitli karbon kaynakları seçilen en uygun karbon kaynağı ile kombinasyon halinde test edilmiştir. Bu amaçla, optimal karbon içeren kitosanaz üretim ortamına ek olarak 5 g L^{-1} konsantrasyonda glikoz, laktoz, melas, selüloz ve çözünebilir nişasta ilave edilmiştir (Choi 2004).

3.2.4.3 Optimum azot kaynağının belirlenmesi

En uygun karbon kaynaklarını seçtikten sonra azot kaynağının taranması, kitosanaz üretim ortamında maya ekstraktı, pepton, tripton, amonyum sülfat ve mısır ıslatma sıvısı 5 g L^{-1} konsantrasyonda kullanılmıştır.

3.2.4.4 Plackett Burman (PB) tasarımıyla önemli değişkenlerin seçimi

Fermantasyon sıvısında enzim üretimini etkileyen faktörlerin belirlenmesi ve optimum değerlerinin saptanması için faktör tarama çalışması, Design Expert programı ile PB tasarımı kullanarak yapılmıştır. Deney tasarımı, Design-Expert® Software Version 7- Stat-Ease yazılımını kullanarak 11 faktör için formüle edilmiştir. Kullanılan yazılım programı bu 11 faktörün alt ve üst seviyeleri arasında değerlerde 12 farklı üretim ortamı ve buna bağlı olarak 12 deneme

belirlemiştir. Her deneme için ortalama kitosanaz aktivitesi (U mL⁻¹) tasarımın yanıtını temsil etmektedir.

3.2.4.5 Merkezi Kompozit Tasarımı (CCD) ile değişkenlerin seviye optimizasyonu

Kitosanaz üretimini en üst düzeye çıkarmak için CCD tasarımını kullanarak önemli değişken seviyeleri optimize edilmiştir. PB ile taranan en önemli dört değişken, beş farklı düzeyde (-2, -1, 0, 1, 2) değerlendirilmiştir. Merkezi noktada altı tekrar içeren 30 deney CCD tasarımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değişkenlerin davranışı, etkileşimleri ve istatistiksel analiz aşağıdaki ikinci dereceden polinom denklemiyle açıklanmıştır.

$$Y = c_0 + c_1 X_1 + c_2 X_2 + c_3 X_3 + c_4 X_4 + c_{12} X_1 X_2 + c_{13} X_1 X_3 + c_{14} X_1 X_4 + c_{23} X_2 X_3 + c_{24} X_2 X_4 + c_{34} X_3 X_4 + c_{11} X_1^2 + c_{22} X_2^2 + c_{33} X_3^2 + c_{44} X_4^2$$

Y öngörülen yanıt ise; X_1, X_2, X_3, X_4 kodlu bağımsız değişkenler; c_0 , kesiş; c_1, c_2, c_3, c_4 doğrusal katsayılar; $c_{12}, c_{13}, c_{14}, c_{23}, c_{24}, c_{34}$ etkileşimli katsayılar; $c_{11}, c_{22}, c_{33}, c_{44}$ kuadratik katsayılardır.

3.2.4.6 Optimizasyon modelinin doğrulanması

İstatistiksel modelle elde edilen optimize üretim ortamı kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiş ve kitosanaz üretimi için doğrulanmıştır.

3.2.5 Kitosanaz saflaştırması

3.2.5.1 Amonyum sülfat ile protein çöktürme ve diyalizi

Enzim üretimi sonrası kültür sıvısı 20 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüjlenerek süpernatant elde edilmiştir. Süpernatant içeriğindeki proteinlerin fraksiyonlanarak ayrılmaları için katı amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Bu işlemde 4°C'de, manyetik karıştırıcı yardımıyla sıvıya katı amonyum sülfatın yavaş yavaş yedirilmesi yöntemi kullanılmıştır. Enzimin en etkin hangi amonyum sülfat yüzdesinde çökeceği kesin olarak bilinmediğinden literatürlerdeki

değerler olan %60, %70, %80, 90% amonyum sülfat oranları denenmiştir. Katı halde ilave edilen amonyum sülfatın yaklaşık 30 dakika karışmasının ardından 4°C’de bir gece bekletilmiştir ve ertesi gün 6000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenerek diyaliz basamağına geçilmiştir. Amonyum sülfatla çöktürülen ve santrifüjlenen süspansiyonun üstte kalan süpernatant kısmı ayrılarak, altta kalan çöktürmeye stabilizasyonun devamını sağlamak için 10 mL 20 mM Tris tamponu (pH 8,0) ilave edilmiştir. Bu solüsyon, 14 kDa’luk molekül ağırlığındaki diyaliz (Sigma, D9527) membranda, bir gece boyunca diyaliz membranı içindeki sıvının 20 katı hacmindeki diyalizat ile diyalizlenmiştir (Liang et al., 2012).

3.2.5.2 İyon değişim kromatografi

Diyalizin ardından örneklerle, Amersham Pharmacia Biotech AKTA FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) 18-1140-45 cihazı kullanılarak, HiTrap Capto DEAE (5 × 5 mL) zayıf anyon değişimi kolonu ile iyon değişim kromatografisi yapılmıştır. Bu amaçla önce 2 mL/dakika akış hızıyla 10 kolon hacmi (50 ml) 2 M NaCl, ardından 20 kolon hacmi (100 ml) 1 M NaOH, ve tekrar 10 kolon hacmi (50 ml) 2 M NaCl ile kolon yıkanarak, pH sabit olana kadar ultra saf su ile durulama yapılmıştır. Daha sonra kolondan ilk dengeleme için, öncelikle 2 mL/dakika akış hızıyla (kolonun 10 katı hacminde) 20 mM Tris (pH 8,0) başlangıç tamponu geçirilerek dengelenmiştir. Örnekler 0,1 mL/dakika akış hızında kolondan akıtılmıştır. Daha sonra kolondan 15 mL başlangıç tamponu 1 mL/dakika akış hızında geçirildikten sonra kolonda tutulmuş olan proteinlerin elüsyonu için 20 mM Tris ve 1M NaCl içeren (pH 8,0) elüsyon tamponu %2’den % 50’ye kadar gradiyent oluşturarak geçirilmiştir. Kolondan fraksiyonlar 5’şer mL’lik hacimlerde toplanmıştır.

Kolonun yeni bir deneme öncesi dengelenmesi için, 10 kolon hacmi (50 ml) başlangıç tamponu 2mL/dakika akış hızında uygulanmıştır. Örneğin geçirilmesinin ardından kolonun temizliği için 10 kolon hacmi ultra saf su ile temizlik tamamlanmıştır. Kolondan en son işlem olarak %20’lik etanol geçirilerek, kolon dolgu materyalinin kuruması önlenmiştir. Fraksiyonların kitosanaz aktivitesi ve protein miktarı ölçülmüştür ve fraksiyonlar konsantre hale getirilmek üzere liyofilize edilmiştir. Fraksiyonlar liyofilize edildikten sonra 1 mL

ultra saf suda çözülmüş ve 4°C’de saklanmıştır. Ham kitosanaz ekstraktın saflaştırma katsayısı 1 kabul edilerek ve diğer fraksiyonların spesifik aktiviteleri ham ekstrakt spesifik aktivitesine oranlanıp saflaştırma katsayıları hesaplanmıştır. Ham kitosanaz ekstraktın verimi 100 kabul edilerek fraksiyonların toplam aktivitesi ham ekstraktın toplam aktivitesine oranlanarak geri kazanım (%) hesaplanmıştır. Formüller aşağıda verilmiştir:

$$\text{Geri kazanım (\%)} = \frac{\text{Her saflaştırma basamağından sonraki toplam enzim aktivitesi (U)}}{\text{Başlangıç ekstraktın toplam enzim aktivitesi (U)}} \times 100$$

$$\text{Saflaştırma katsayısı} = \frac{\text{Her saflaştırma basamağından sonraki spesifik aktivitesi (U mg⁻¹)}}{\text{Başlangıç ekstraktın spesifik aktivitesi (U mg⁻¹)}}$$

3.2.5.3 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

Kısmi saflaştırmada konsantre edilen fraksiyonları SDS-PAGE Laemmli yöntemi ile görüntülenerek enzimin molekül ağırlığı belirlenmiş ve saflaştırmada gerçekleştirilen ayırım ortaya konmuştur. Bu amaçla, SDS-PAGE aparatının (BioRad, Mini-PROTEAN Tetra Cell) camları sırasıyla distile su, etanol ve izopropanol ile silindikten sonra jelin dökülmesi için camlar ve spacerlardan oluşan aparat hazır hale getirilmiştir. İlk önce %12 ayırma jeli (separating) hazırlanıp, aparata dökülmüştür ve üst yüzeyi izopropanol ile düzleştirilerek donması için 30-40 dakika bekletilmiştir. Donan ayırma jelinin üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldıktan sonra depolama jeli (stacking) hazırlayıp, aparata dökülerek tarak yerleştirilmiş ve donması için 30-40 dakika bekletilmiştir. Camlar yürütme aparatı üzerine yerleştirilerek alt ve üst hazneler yürütme tamponu (1X SDS-PAGE Running Buffer) ile doldurulmuştur. Tarak donmuş jelden yavaşça çıkartıp ve kuyucuklar içerisinde kalan jel parçaları yüklemeyen önce tampon ile temizlenmiştir. 30 µL örnek solüsyonu üzerine 10 µL anyonik bir denatürasyon deterjanı olan sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren 4X yükleme tamponundan (4X Loading buffer veya Laemli Buffer) eklenmiştir. Hazırlanan örnekler 95-100°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler hemen buz üzerine alınmıştır. Buz üzerinde bekleyen örnekler kısa bir vorteksleme yapıldıktan sonra 30 µL hacimde jele yüklenmiştir. Bir kuyucuğa protein boyutunun belirlenebilmesi ve elektroforetik yürüyüşün izlenebilmesi amacıyla 5 µL

moleküler ağırlık markörü P7706-gel NEB (Blue Prestained Protein Standard, 11-190 kDa) yüklenmiştir. Elektrot bağlantıları yapılarak jelde yürütme işlemi 80V'da 3-5 saatte tamamlanmıştır. Jel yürütme işlemleri bittikten sonra jel Coomassie Brilliant Blue boya ile resiprokal hareket eden çalkalayıcı üzerinde 20-40 rpm hızla çalkalayarak 15 dakika boyanmıştır. Jel görüntülenmesi için boyanın geri alınması amacıyla hacminin 3-4 katı boya giderici solüsyonuda bir gece boyunca çalkalamaya bırakılmıştır. Boya yeterince giderildiğinde jelin fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.6 Kitosanaz enziminin kısmi karakterizasyonu

3.2.6.1 Enzimin Optimum sıcaklığının belirlenmesi

Kitosanaz aktivitesi için optimum sıcaklık, Tzu-Wen Liang, 2015 yöntemine göre belirlenmiştir. 1 U (20 µL) saflaştırılmış enzim, 0,5 mL %1'lik çözünür kitosan ve 0,48 mL reaksiyon tamponu olarak asetat tamponu (pH 5,5) ile karıştırılmış ve 20-100°C (20, 25, 30, 37, 40, 50, 55, 60, 70, 80, 90 ve 100) arasında değişen sıcaklıklarda 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu sıcaklıkları (40, 50, 55, 60, 70, 80, 90 ve 100°C) oluşturmak için su banyosu kullanılmıştır. Kitosanaz aktivitesi, daha önce 3.2.3.2'de bahsedilen kitosanaz aktivite ölçüm yöntemine göre ölçülmüştür. Tüm ölçümler üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.6.2 Enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi için substrat olmadan, enzimi, farklı sıcaklıklarda (30, 40, 50, 55, 60, 70, 80 ve 90°C) 1 saat boyunca sodyum asetat tamponu içinde inkübe ederek belirlenmiştir. Kalan kitosanaz aktivitesi, daha önce 3.2.3.2'de bahsedilen kitosanaz aktivite ölçüm yöntemine göre ölçülmüştür. Tüm ölçümler üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.6.3 Enzimin optimum pH'sının belirlenmesi

Kitosanaz aktivitesi için optimum pH, Tzu-Wen Liang, 2015 yöntemi ile incelenmiştir. Optimum pH, 3-11 (3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 ve 11,0) aralığında pH değerlerine sahip olan farklı

tampon sistemleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu tür pH aralıkları oluşturmak için, 20 mM asetat tamponu (pH 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 6,0 ve 6,5), 20 mM fosfat tamponu (pH 7,0, 7,5 , 8,0, 8,5 ve 9,0) ve 20 mM sodyum bikarbonat tamponu (pH 9,5, 10,0, 10,5 ve 11,0) reaksiyon tamponları olarak kullanılmıştır. Saflaştırılmış enzimden 1 U, 0,5 mL% 1'lik çözünür kitosan ve 0,48 mL reaksiyon tamponlarıyla karıştırılmış ve optimum sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Kitosanaz aktivitesi, daha önce 3.2.3.2'de bahsedilen kitosanaz aktivite ölçüm yöntemine göre ölçülmüştür. Tüm ölçümler üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.6.4 Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi için, enzim substratlar olmaksızın 3-11 (3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 ve 11,0) arasındaki farklı pH tamponlarında 25°C'de 3 saat inkübe edildikten sonra, 3.2.3.2'de tarif edildiği gibi standart koşullar altında kalan kitosanaz aktivitesinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Tüm ölçümler üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.6.5 Saflaştırılmış enzimin substrat özgünlüğü

Saflaştırılmış kitosanaz (1 U), 20 mM sodyum asetat tamponu içinde optimum pH ve sıcaklıkta 30 dakika boyunca %1 konsantrasyonunda çeşitli substratlar (Çizelge 3.2) ile inkübe edilmiştir ve enzim aktivitesi test edilmiştir (Shivakumar et al., 2014; Zhang et al., 2015). Tüm ölçümler üç kez tekrarlanmıştır.

Çizelge 3.2. Saflaştırılmış enzimin substrat özgünlüğü çalışmasında kullanılan substratlar ve kullanım şekilleri.

Substratlar	Kullanım şekilleri
Kitosan, düşük moleküler ağırlık 75-85% deasetilatlı (Sigma 448869)	Çözünür, koloidal ve süspanse
Kitosan, karides kabuklarından, ≥75% deasetilatlı (Sigma C3646)	Çözünür, koloidal ve süspanse
Kitin (Sigma C7170)	Koloidal ve süspanse
α-Selüloz (Sigma 6429)	Çözünür
Çözünür nişasta (Sigma 9765)	Çözünür

3.2.6.6 Enzim kinetiği ile ilgili çalışmalar

Safılaştırılmış kitosanazın Michaelis-Menten sabitlerini (K_m ve V_{max}) değerlendirmek için Lineweaver-Burk yöntemi ve substrat olarak kitosan kullanılmıştır. Reaksiyonlar 10 dakika boyunca optimum koşullar altında 20 mM sodyum asetat tamponu içinde, 0,16-20 mg mL⁻¹ (0,16, 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 ve 20 mg mL⁻¹) arasındaki farklı substrat konsantrasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümler üç kez tekrarlanmıştır (Zhang et al., 2015).

3.2.6.7 Metal iyonlarının ve bazı kimyasalların enzim aktivitesine etkileri

Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisi, 5 mM konsantrasyonda reaksiyon tamponu içinde hazırlanan çeşitli metal iyonları kullanarak ölçülmüştür. Kitosanaz (1 U) 500 µL metal iyonları ile 25°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra kalan aktiviteleri, standart koşullar altında optimum pH ve sıcaklıkta belirlenmiştir. (Ben Amar Cheba 2016; You-Young JO; Srividya Shivakumar; Tzu-Wen Liang). metal iyonları olarak Mg²⁺, Mn²⁺, K⁺, Ca²⁺, Hg²⁺, Fe²⁺, Ba²⁺, NH₄²⁺, Mo²⁺, Na⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, ile SDS, EDTA (Etilendiaminetetra-asetat)'ın enzim aktivitesine etkileri incelenmiştir. Kontrol olarak herhangi bir metal iyonu ilave edilmemiş enzim kullanılmıştır. Tüm ölçümler üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.7 Enzimatik olarak kitooligosakkaritlerin üretimi

Çalışmamızda incelenen *Bacillus* suşlarından elde edilen kitosanaz enzimleri ile enzimatik olarak kitooligosakkaritlerin üretimi incelenmiştir. Bunun için öncelikle kitooligosakkaritlerin kantitatif analizi için yöntem optimizasyonu ve enzimatik olarak kitooligosakkaritlerin üretim optimizasyonu yapılmıştır.

3.2.7.1 Kitooligosakkaritlerin kantitatif analizi için HPLC yöntem optimizasyonu

Çalışmamızda enzimatik olarak üretilecek olan kitooligosakkaritlerin kantitatif analizi için HPLC kullanılmıştır. Öncelikle kitooligosakkarit standartlarının kitobiyoz, kitotrioz, kitotetroz, kitopentoz ve kitoheksoz

(chitobiose, chitotriose, chitotetrose, chitopentose ve chitohexose) (Megazyme, İrlanda) 1 mg mL⁻¹ konsantrasyonda ayrı ayrı standartları ve farklı konsantrasyonlarda (her bir standarttan 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12.5 ppm, 6.25 ppm ve 3.125 ppm) karışımı (COS-Mix) standartları hazırlanmıştır. Bu standartlarla kalibrasyon eğrilerini çıkarmak için HPLC analizleri yapılarak yöntem optimize edilmeye çalışılmıştır. Kitoooligosakkaritstandartlarıyla yöntem optimizasyonunda literatürde önerilen farklı dedektör ve kolonlar denenmiştir.

3.2.7.2. HyperRez XP Carbohydrate H+ kolonu

Standart eğrilerin hazırlanmasında Refraktif İndeks dedektörüne sahip HPLC’de HyperRez XP Carbohydrate H⁺ kolonu (8 µm) (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Kitoooligosakkaritleri zincir uzunluğuna göre ayırması için 1 mg mL⁻¹ konsantrasyonda ayrı ayrı standartları 10 µL hacimde, kolona enjekte edilerek, 50°C’de 5 mM H₂SO₄ ile 1 mL dk⁻¹ akış hızında izokritik olarak ayrılmıştır. Farklı akış hızları (1 mL dk⁻¹, 0,4 mL dk⁻¹ ve 0,3 mL dk⁻¹) ile birlikte farklı sıcaklıklar (23°C, 50°C) ile de aynı işlem tekrar edilmiştir (Hamer et al., 2015).

3.2.7.3. Hypersil APS-2 Amino kolonu

Hypersil APS-2 Amino kolon (5 µm, 100mm) (Thermo Scientific) kullanarak UV dedektörüne sahip HPLC’de kitoooligosakkaritlerin zincir uzunluğuna göre ayırması için 1 mg mL⁻¹ konsantrasyonda ayrı ayrı standartları 10 µL hacimde, kolona enjekte edilerek 90°C’de mobil faz olarak farklı oranlarda asetonitril ile su (75:25, 70:30) denenmiştir (Chang et al., 2001).

3.2.7.4. Phenomenex RNM-Carbohydrate Na⁺ kolonu

Phenomenex RNM-Carbohydrate Na⁺ (300 x 7,8 mm) kolon ile Refraktif İndeks dedektörüne sahip HPLC’de kitoooligosakkaritlerin zincir uzunluğuna göre ayırması için 1 mg mL⁻¹ konsantrasyonda ayrı ayrı standartları 10 µL hacimde, kolona enjekte edilerek, 50°C’de 5 mM H₂SO₄ ile farklı akış hızları (1 mL dk⁻¹, 0,6 mL dk⁻¹, 0,4 mL dk⁻¹, 0,3 mL dk⁻¹ ve 0,1 mL dk⁻¹) ile birlikte farklı sıcaklıklar (25°C, 45°C, 50°C, 70°C) ile analizleri yapılmıştır. En son bu kolon ile Refraktif

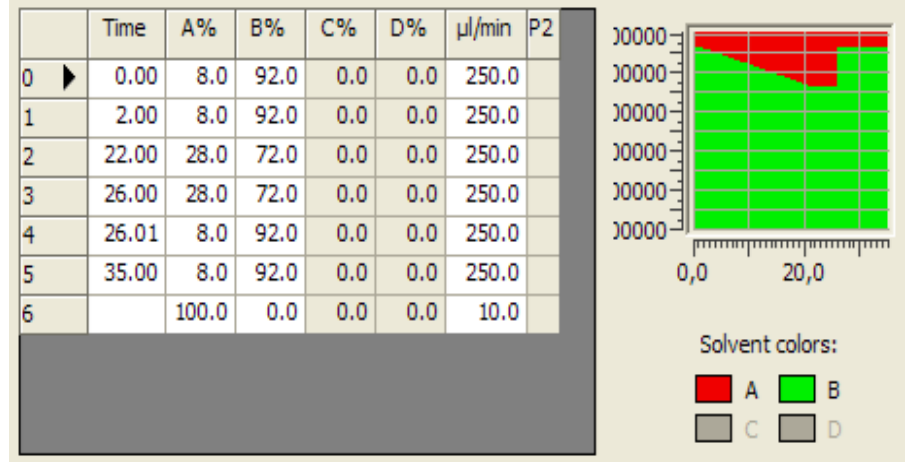
İndeks dedektörüne sahip HPLC’de, kolon sıcaklık 70°C’de, mobil faz olarak % 100 ultra saf su kullanarak 0,1 dk⁻¹ lik bir akış hızı kullanılmıştır.

3.2.7.5 Shodex Asahipak NH₂P-50 4E kolonu

HPLC analizi, Thermo Scientific Accela, DAD dedektörü, otomatik örnekleme, kuaterner pompa, kolon fırını (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, ABD) ve Shodex Asahipak NH₂P-50 4E (4.6mmID*250mm) kolon ile donatılmış HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak ultra saf su (A) ve asetonitril (B) kullanılmış ve gradiyent elüsyonu kullanılarak, 0 dakikada 15A/85B ile başlayıp kompozisyon 2 dakikada 18A/82B’ye, sonraki 18 dakikada 35A/65B’ye değiştirilmiş ve ardından 20 dakika boyunca 15A/85B ile devam edilmiştir (toplam çalışma süresi 40 dakika). Bir sonraki enjeksiyondan önce, kolon başlangıç koşullarıyla 20 dakika dengelenmiştir. Dedeksiyon dalga boyu, akış hızı ve kolon sıcaklığı sırasıyla 205 nm, 1 mL dk⁻¹ ve 30°C’ye ayarlanmıştır. Tüm örnekler ve standartlar (2000 ppm konsantrasyonda ayrı ayrı standartları) için enjeksiyon hacmi 10 µL kullanılmıştır.

3.2.7.6 Hypersil APS-2 Amino kolonu

HPLC analizi, Thermo Scientific Accela, DAD dedektörü, otomatik örnekleme, kuaterner pompa, kolon fırını (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, ABD) ve Hypersil APS-2 Amino kolonu (5 µm, 100mm) (Thermo Scientific) ile donatılmış HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak ultra saf su (A) ve asetonitril (B) kullanılmış ve gradiyent elüsyonu yöntemi (Şekil 3.4) kullanılarak, 0 dakikada 8A/92B ile başlayıp kompozisyon 22 dakikada 28A/72B’ye değiştirilmiş ve 26 dakika kadar devam edilmiştir. 26.01 dakkikada kompozisyon yine 8A/92B’ye değiştirilmiş ve bir sonraki enjeksiyondan önce kolon başlangıç koşullarıyla 10 dakika dengelenmiştir (toplam analiz süresi 35 dakika). Dedeksiyon dalga boyu, akış hızı ve kolon sıcaklığı sırasıyla 205 nm, 250 µl dk⁻¹ ve 30°C’ye ayarlanmıştır. Tüm örnekler ve standartlar (200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12.5 ppm, 6.25 ppm ve 3.125 ppm) için enjeksiyon hacmi 10 µL kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Gradiyent elüsyonu yöntemi.

3.2.7.7 Optimize edilmiş HPLC yöntemiyle kalibrasyon eğrisinin çıkarılması

Kalibrasyon eğrisi, farklı konsantrasyonlarda (200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12.5 ppm, 6.25 ppm ve 3.125 ppm) karışımı (COS-Mix) içerisinde, ultra saf su ile hazırlanan COS standartları (kitobiyoz, kitotrioz, kitotetroz, kitopentoz ve kitoheksoz) kullanılarak elde edilmiştir.

3.2.7.8 Kitosanın enzimatik hidrolizi

Kitosanın enzimatik hidrolizi de Assis et al, 2010 ve Hamer et al., 2015'deki yöntemlerin modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. 3.2.3.1'de anlatıldığı şekilde elde edilen ham enzim ekstraktı reaksiyondan önce fermentasyon sıvısından gelen tuzların uzaklaştırılması için 14 kDa'luk MW diyaliz membranda (Sigma, D9527), bir gece boyunca ultra saf suya karşı diyalizlenmiştir. Kitosanın enzimatik hidrolizi için enzim: çözünmüş kitosan: tampon 2:5:3 oranda karıştırılmıştır. Tampon olarak 20 mM sodyum asetat tamponu kullanılmıştır (de Assis et al, 2010; Choi et al., 2004; Pagnoncelli ve ark., 2010). Reaksiyon karışımı 50°C'de (de Assis et al, 2010) 130 rpm'de 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir enzimatik reaksiyon, kaynar suda 10 dakika boyunca kaynatılarak durdurulmuş ve hidrolizat, hidrolize edilmeden kalabilecek kitosanın uzaklaştırılması için 6000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir ve süpernatant 0,45 μm'lik şırınga filtresi ile filtrelenmiştir. Her bir hidrolizat HPLC ile incelenmiştir.

3.2.7.9 HPLC analizi için örneklerin hazırlanması

Hazırlanan hidrolizatların her biri var olabilecek diğer metabolitlerin uzaklaştırılması için katı faz ekstraksiyon (solid phase extraction, SPE) kolonu (Dionex™ SolEx™ C18 Silica-Based SPE Cartridges, Thermo Scientific) ile konsantre edilmiştir. SPE prosedüründe kullanmak üzere en uygun çözgeni seçmek için farklı konsantrasyonlarda (%0-100) aseton, asetonitril ve metanol gibi farklı solventler ayrı ayrı denenerek COS standartları kullanılarak hidrolizatlarda COS varlığının saptanması için HPLC ile test edilmiştir. En uygun çözgen ve kullanım oranı belirlendikten sonra 0,5 mL hidrolizat ve 1,5 mL seçilen çözgen optimum konsantrasyonda kullanılarak SPE'den geçirilmiştir.

3.2.7.10 İncelenen *Bacillus* suşlarının kitosanaz enzimlerinden kitooligosakkarit üretiminin taranması

COS üretimi ve HPLC ile kantitatif analiz yöntemi optimize edildikten sonra çalışmamızda incelenen farklı *Bacillus* suşlarından elde edilen ham enzim ekstraktları kullanılarak kitosandan enzimatik hidroliz ile COS üretimleri kantitatif olarak belirlenmiştir. COS ürünlerinin Relatif verim (%) aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$\text{Relatif Verim (\%)} = \frac{\text{Toplam COS konsantrasyonu (ppm)}}{\text{Başlangıç kitosan konsantrasyonu (ppm)}} \times 100$$

3.2.8 İstatistiksel analizler

Yapılan denemelerde, analiz sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda ise Tukey's post hoc test kullanılmıştır. Söz konusu istatistik analizlerin yapılmasında IBM SPSS Statistics (versiyon 23.0) istatistik paket programından yararlanılmıştır. Tüm yapılan istatistikler %95 ($p \leq 0.05$) güven aralığına göre yorumlanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

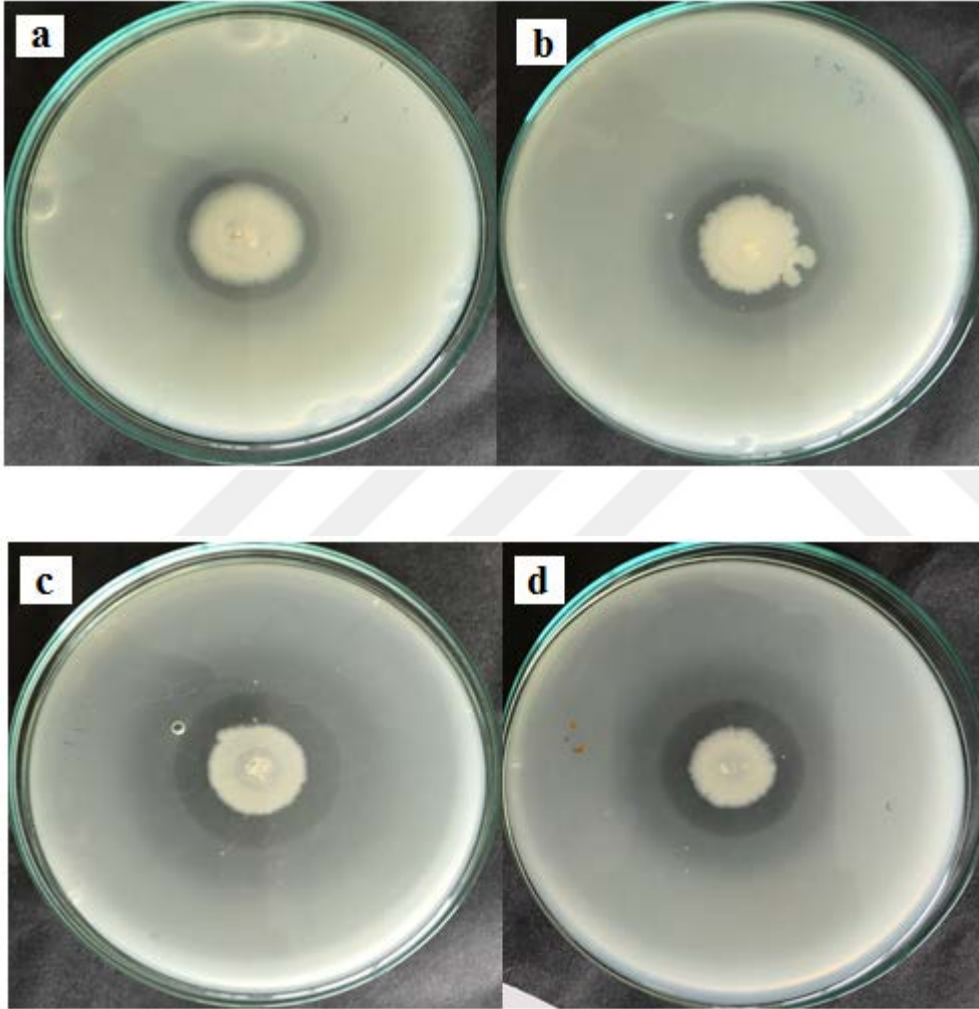
Çalışmamızda enzimatik olarak kitooligosakkaritlerin üretimi amaçlandığından öncelikle moleküler olarak tanımlanmış ve GenBank erişim numarasına sahip kitinolitik enzim aktivitesine sahip olduğu bilinen 16 farklı yerel *Bacillus* suşu kullanılmıştır. İlk olarak *Bacillus* suşlarının kitinaz ve kitosanaz aktiviteleri belirlenmiştir. Kitosanaz aktiviteleri, kitinaz aktivitelerine kıyasla çok daha yüksek bulunduğundan, ilerleyen çalışmalar için kitosanazlar kullanılmıştır. Daha sonra, kitosanaz enziminin üretim optimizasyonu, kısmi saflaştırması ve karakterizasyonu için *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşu seçilmiştir. Son olarak, kitooligosakkaritlerin enzimatik üretimi, *Bacillus* suşlarının ham enzim çözeltileri kullanarak üretilen kitooligosakkaritlerin kantitatif analizi HPLC ile yapılmıştır. Araştırmanın sonuçları bu bölümde aşağıda sunulmuştur.

4.1. *Bacillus* Suşlarının Kitinolitik Aktiviteleri

Bacillus türleri zorunlu aerobik veya fakültatif anaerobiktir ve hem serbest yaşayan hem de patojenik türleri içermektedir. *Bacillus* türleri kısa fermantasyon döngüsü sürelerine neden olan yüksek büyüme hızları, proteinleri hücre dışına salgılama kapasiteleri ve *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis* gibi türler için FDA tarafından GRAS statüsünün verilmiş olması gibi çeşitli nedenlerle dikkat çekici endüstriyel organizmalardır. Bundan başka endüstriyel proseslerde bu organizmaların daha fazla gelişmesini ve daha yaygın kullanılmasını kolaylaştıran *Bacillus subtilis* ve diğer türlerin biyokimyası, fizyolojisi ve genetiği hakkında çok şey bilinmesidir (Su et al., 2006).

Kitinazlar ve kitosanazlar, glikosidik bağları hidrolize ederek kitin ve kitosanı düşük moleküler ağırlıklı kitooligosakkaritlere dönüştürme yeteneğine sahip olan glikosidik hidrolazlardır (Heggset et al., 2010). *Bacillus* türleri önceden beri hem kitinazların hem de kitosanazların üretimi için iyi bilinmektedir. Bu çalışmada, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü "*Bacillus* Kültür Koleksiyonundan" kitinolitik enzim aktivitesine sahip olduğu bilinen 16 farklı yerel *Bacillus* suşu, kitinolitik enzimlerinin (kitinaz ve kitosanazlar) kitooligosakkarit üretme yeteneklerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

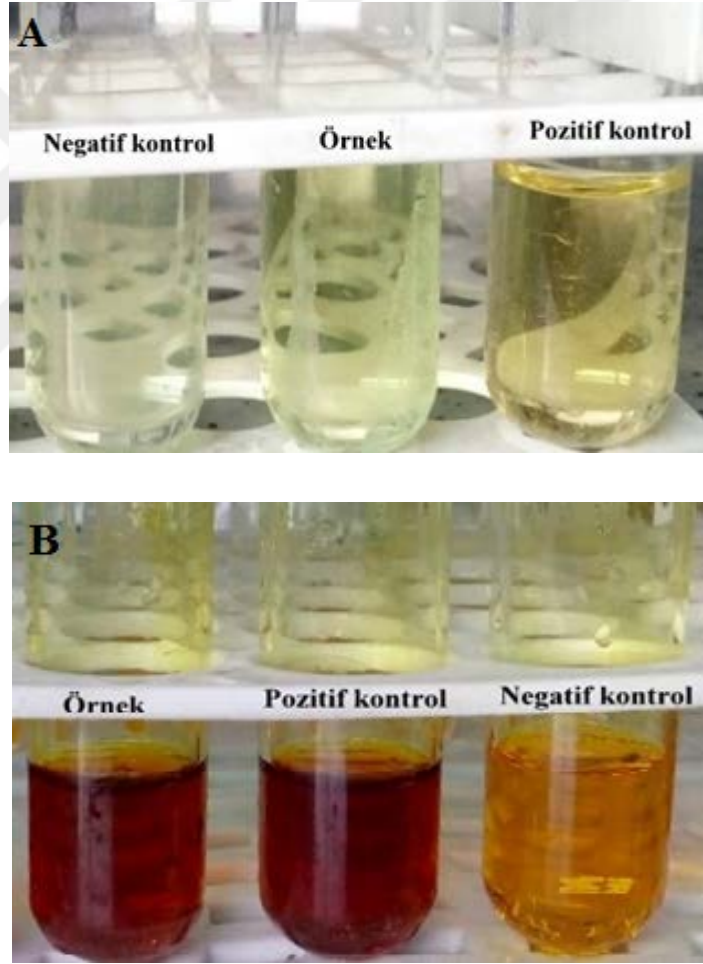
Tüm suşlar, öncelikle katı besi yerinde tarama yöntemiyle kitinaz ve kitosanaz üretiminin doğrulanması için taranmıştır. Suşların her biri sırasıyla, kitinaz ve kitosanaz üretiminin taranması için tek karbon kaynağı olarak kolloidal kitin ve kolloidal kitosan içeren agarlı besiyerleri üzerine aşılanmıştır. Agar plakaları 30°C'de inkübe edilmiştir ve bakteri kolonilerinin gelişmesi ve kitin ve kitosan içeren besiyerlerinde oluşması beklenen hidroliz zonu için her gün incelenmiştir.



Şekil 4.1. *Bacillus cereus* EGE-B-5.5m (a) ve *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i (b) suşların kolloidal kitin içeren besiyerinde şeffaf hidroliz zonları. *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i (c) and *B. thuringiensis* EGE-B-14.1i (d) suşların kolloidal kitosan içeren besiyerinde şeffaf hidroliz zonları.

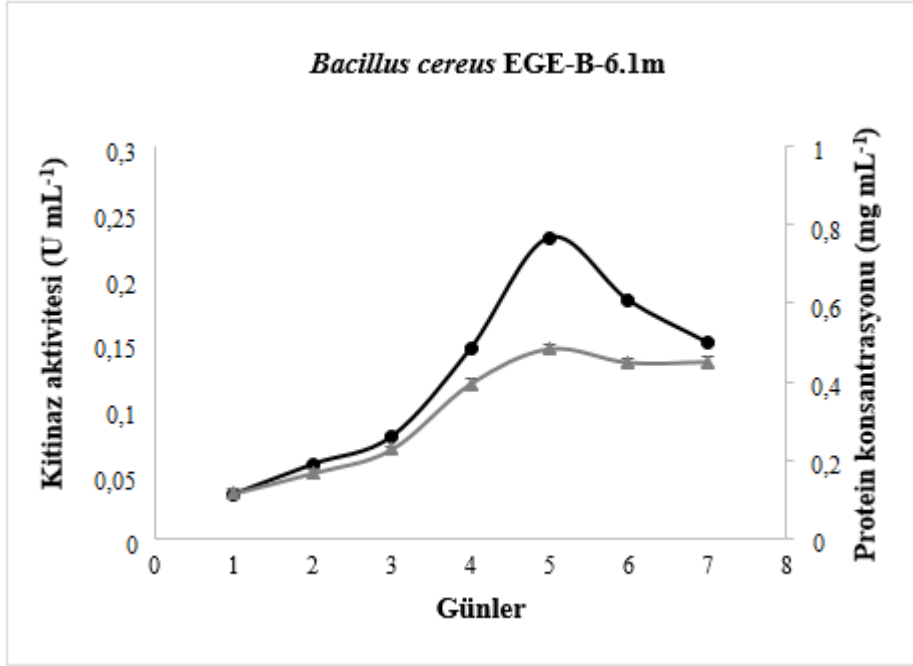
Tarama sonuçları, tüm *Bacillus* suşlarının kolloidal kitin ve koloidal kitosan agar besiyeri üzerinde büyüme gösterdiğini ve tüm suşların kitin ve kitosan hidrolizi zonu ürettiğini göstermektedir (Şekil 4.1). Bu sonuçlar, incelenen

Bacillus suşlarının hem kitin hem de kitosanı karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma becerisine sahip olduklarını doğrulamıştır. Bununla birlikte, tüm suşlarda kitin kullanımının, kitosan ile karşılaştırıldığında çok daha yavaş olduğu belirlenmiştir. Daha sonra *Bacillus* suşları sırasıyla, kitinaz ve kitosanaz aktivitesini ölçmek için koloidal kitin ve koloidal kitosan içeren sıvı ortamlarda büyütüldükten sonra, kitinaz aktivitesinin ölçümünde Schales yöntemi, kitosanaz aktivitesi ölçümünde ise DNS yöntemi kullanılmıştır (Şekil 4.2). Her bir *Bacillus* suşunun günlere göre belirlenmiş olan kitinaz ve kitosanaz aktiviteleri ile birlikte toplam protein miktarları Şekil 4.3-Şekil 4.18'de sunulmuştur. Her bir değer, üç tekrarların ortalama $\pm$ standart sapma ($\pm$ SS) değerini sunmaktadır.

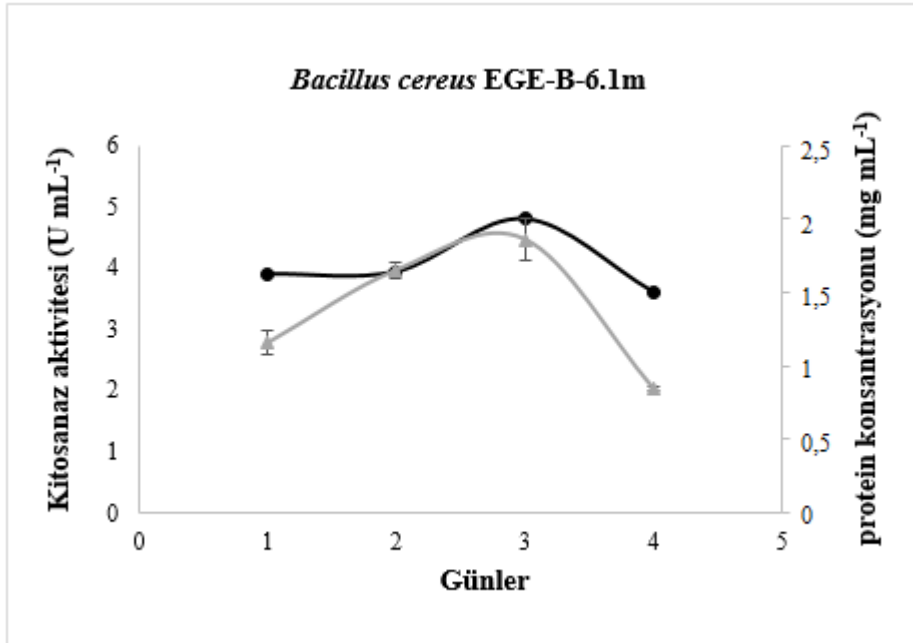


Şekil 4.2. Schales metodu ile kitinaz aktivitesi ölçümü (A), DNS metodu ile kitosanaz aktivitesi ölçümü (B).

A

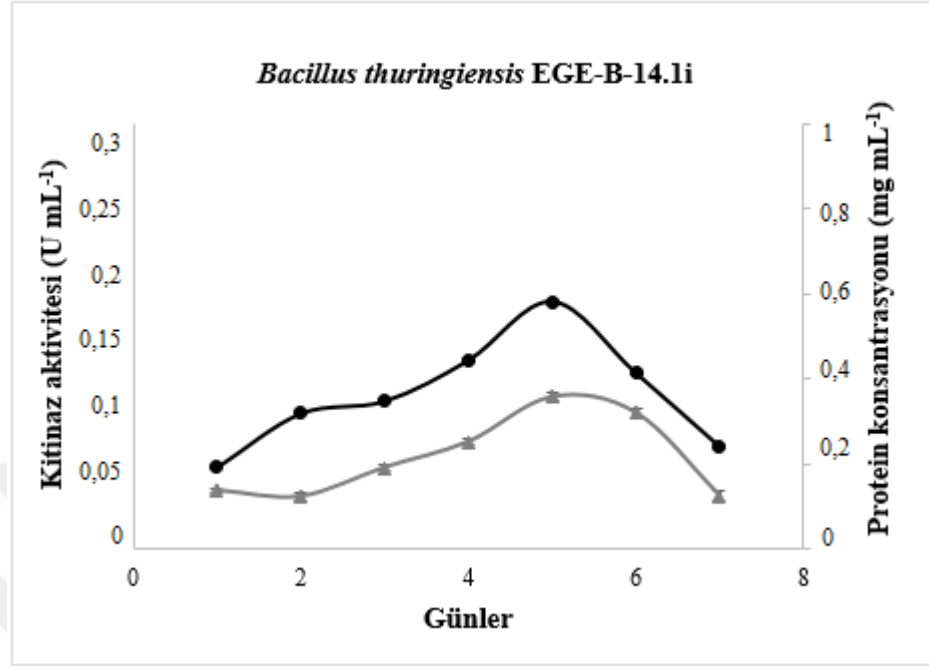


B

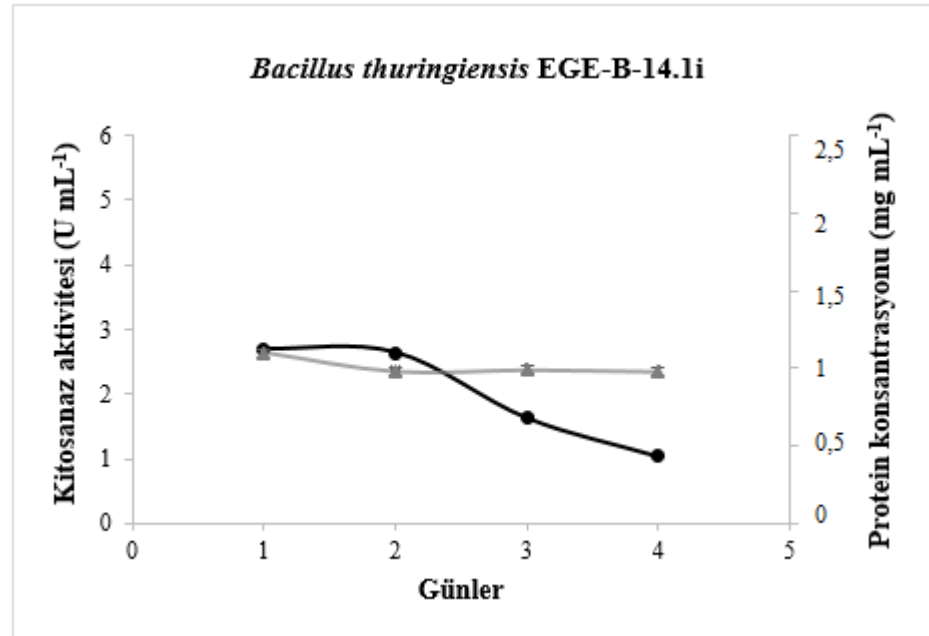


Şekil 4.3. Farklı günlerde *Bacillus cereus* EGE-B-6.1m suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

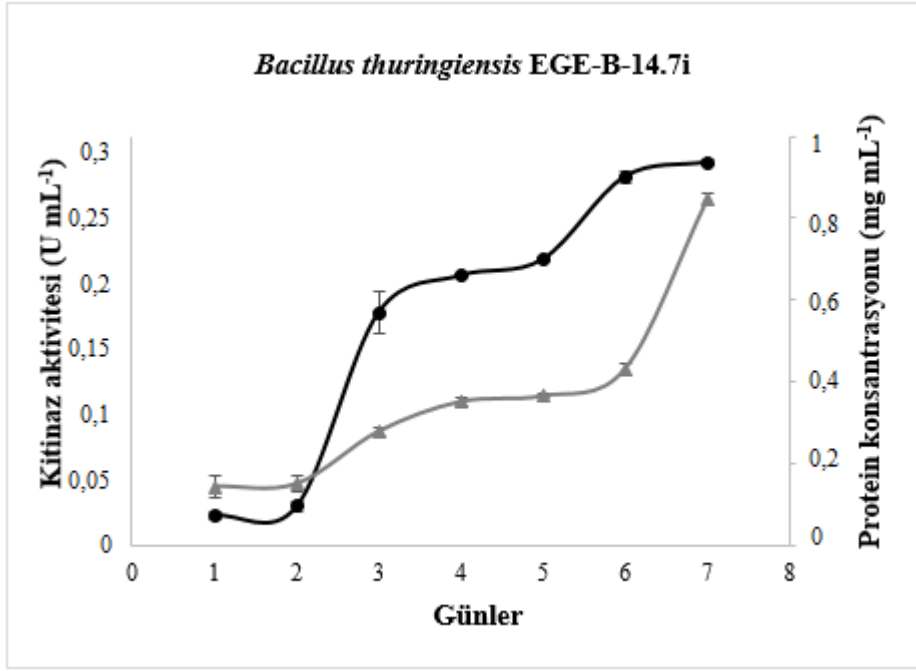


B

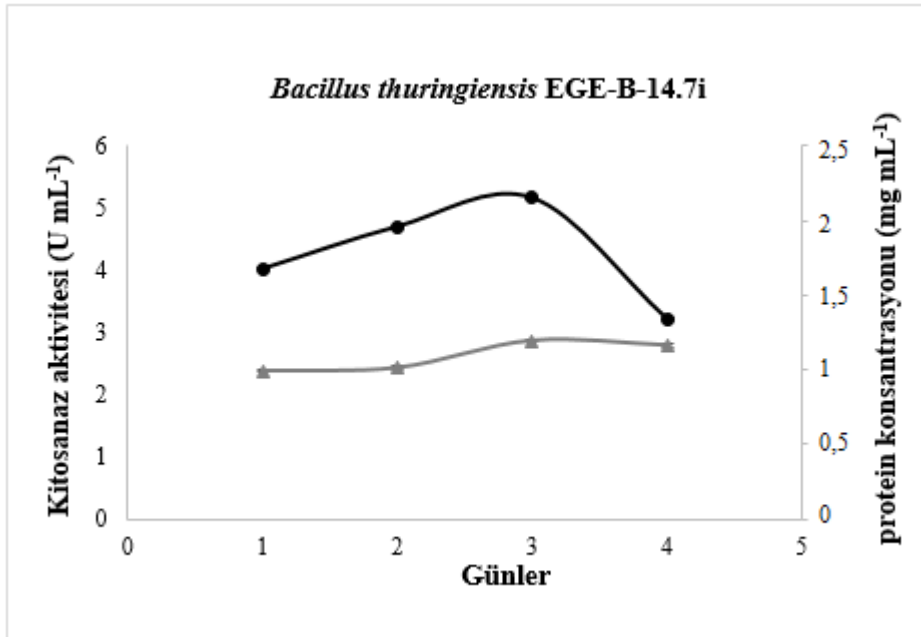


Şekil 4.4. Farklı günlerde *Bacillus thuringiensis* EGE-B-14.1i suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

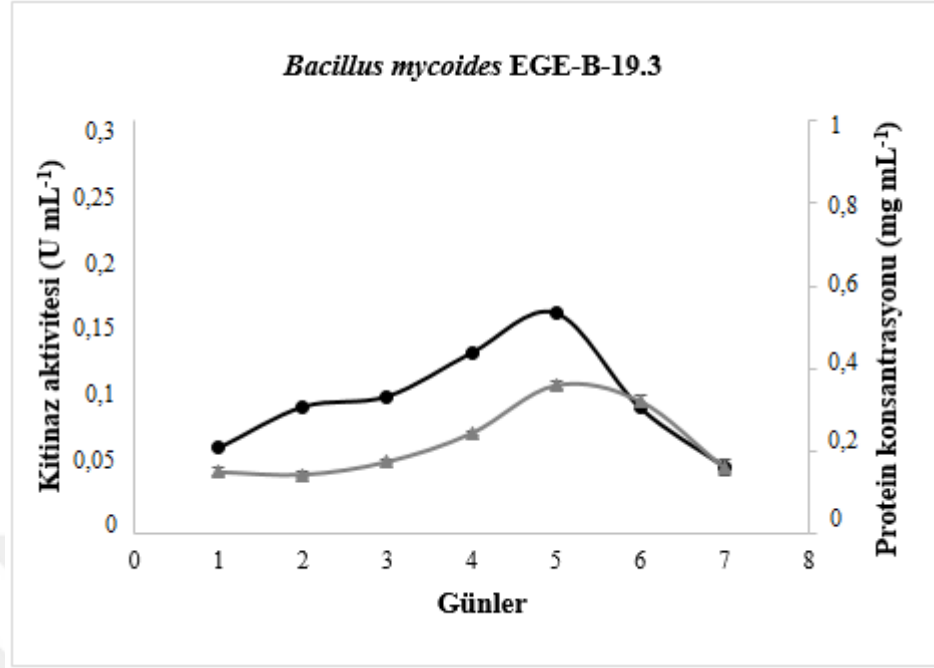


B

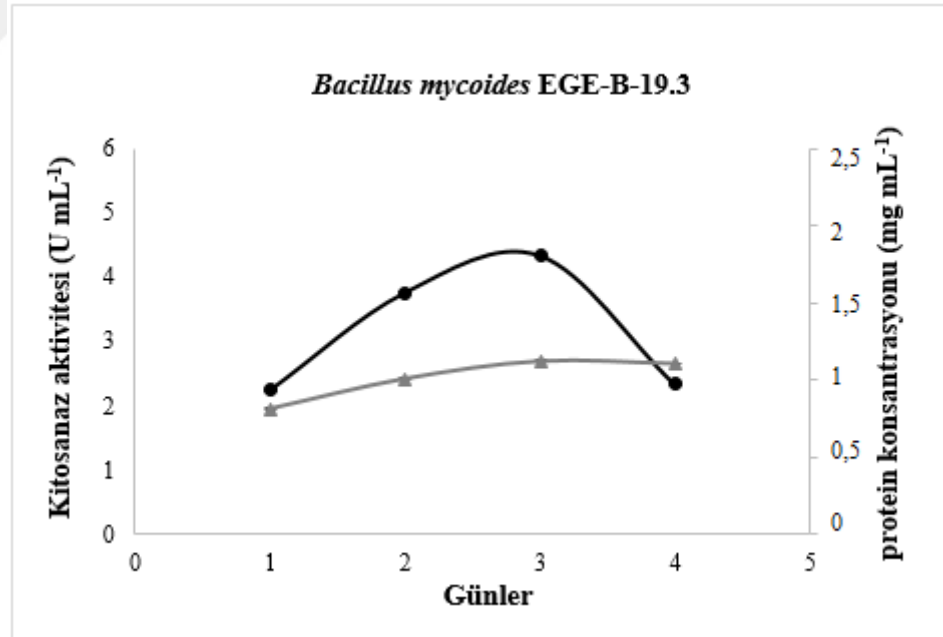


Şekil 4.5. Farklı günlerde *Bacillus thuringiensis* EGE-B-14.7i suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

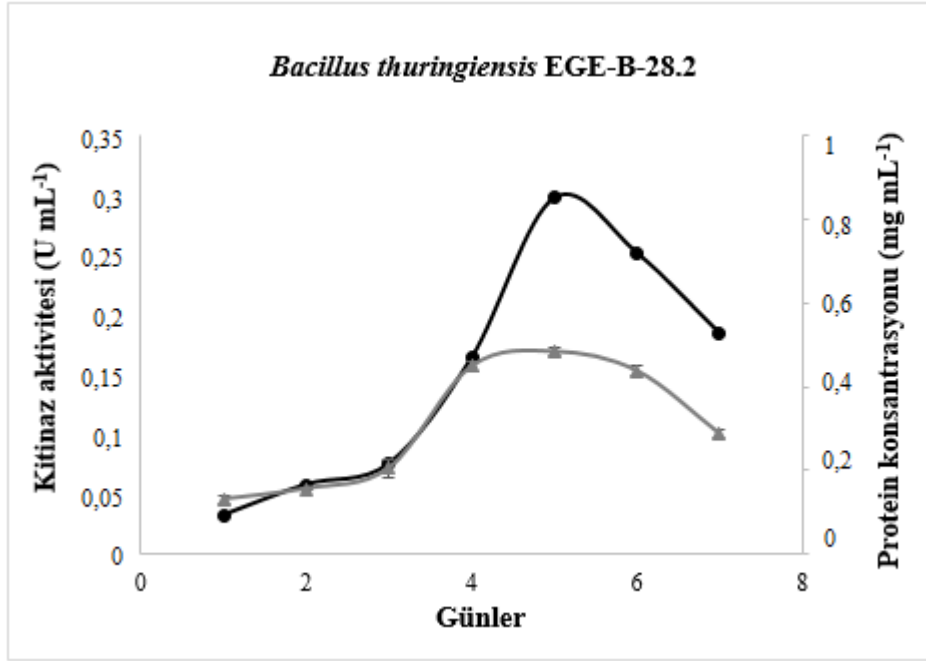


B

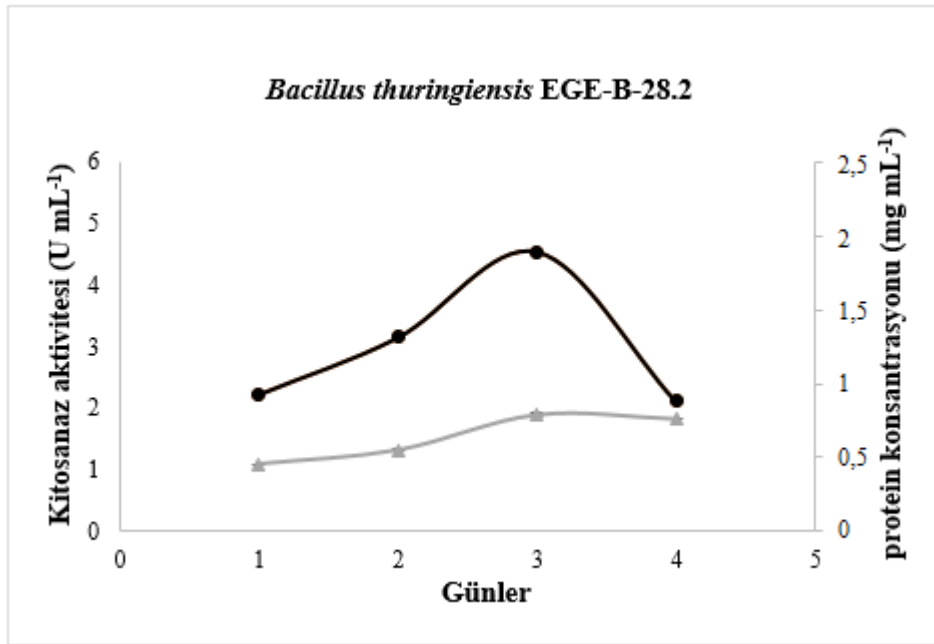


Şekil 4.6. Farklı günlerde *Bacillus mycoides* EGE-B-19.3 suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

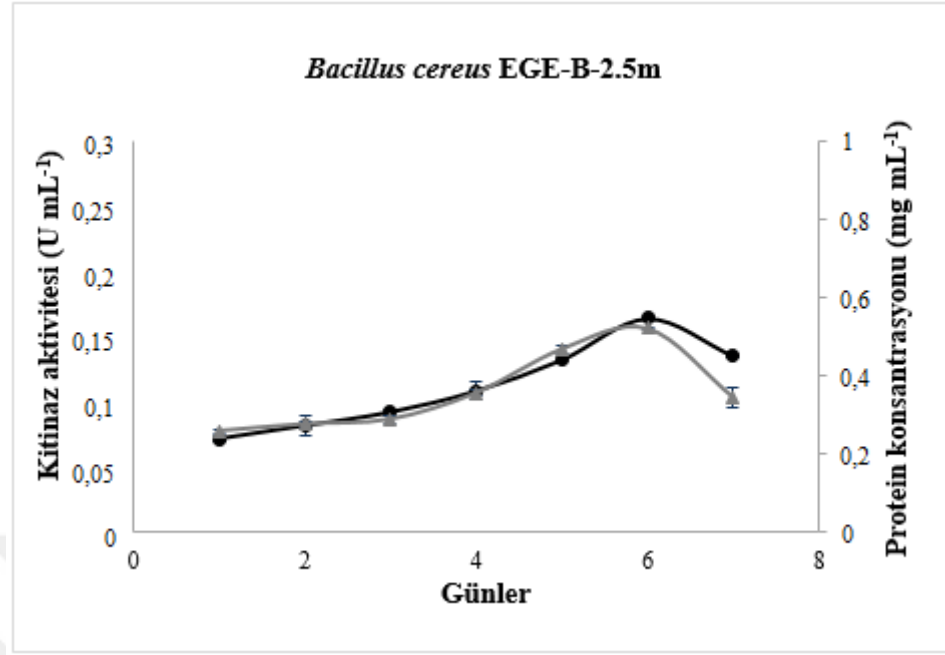


B

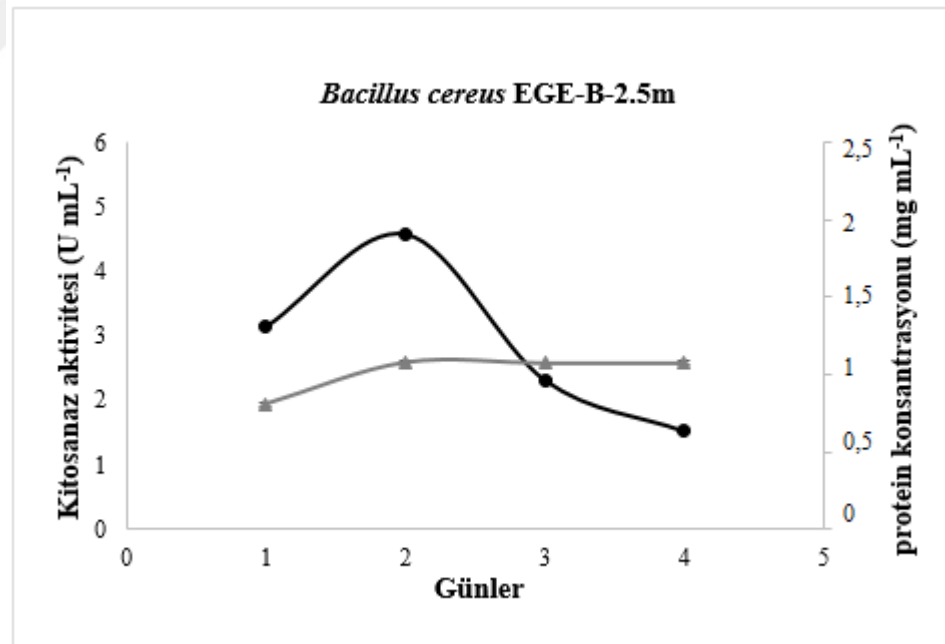


Şekil 4.7. Farklı günlerde *Bacillus thuringiensis* EGE-B-28.2 suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

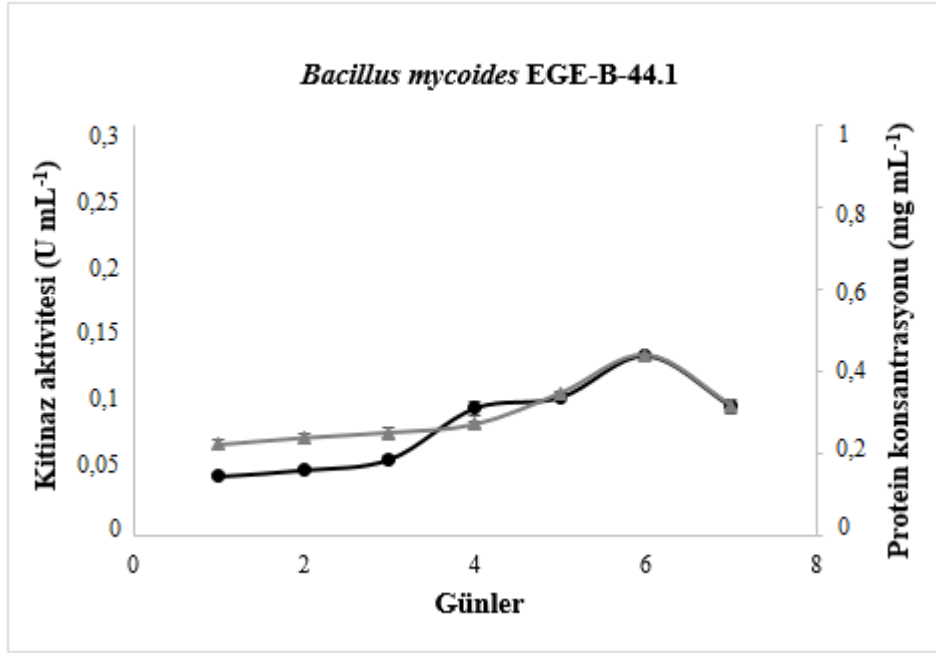


B

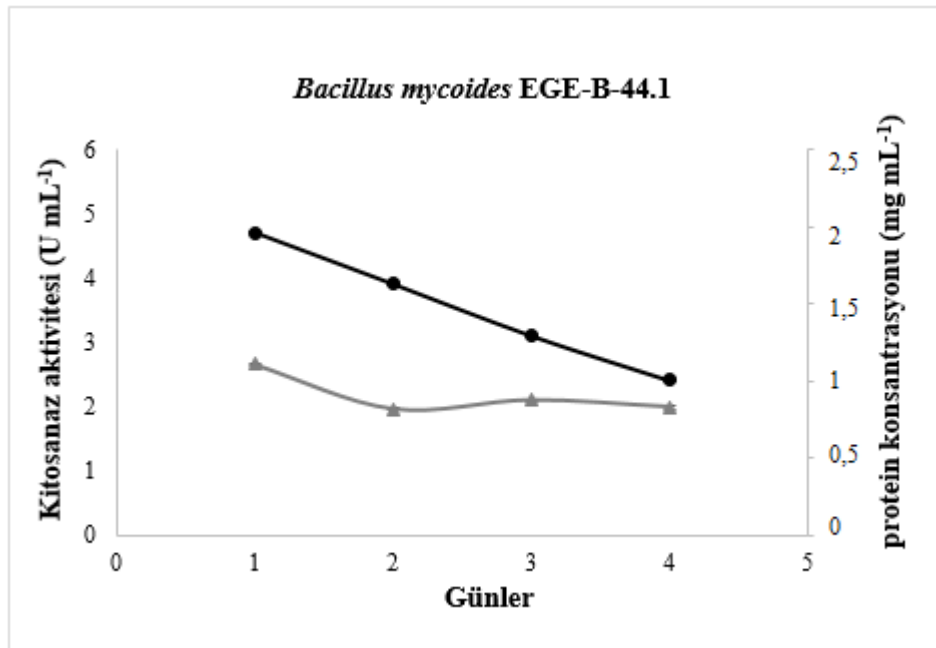


Şekil 4.8. Farklı günlerde *Bacillus cereus* EGE-B-2.5m suşun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

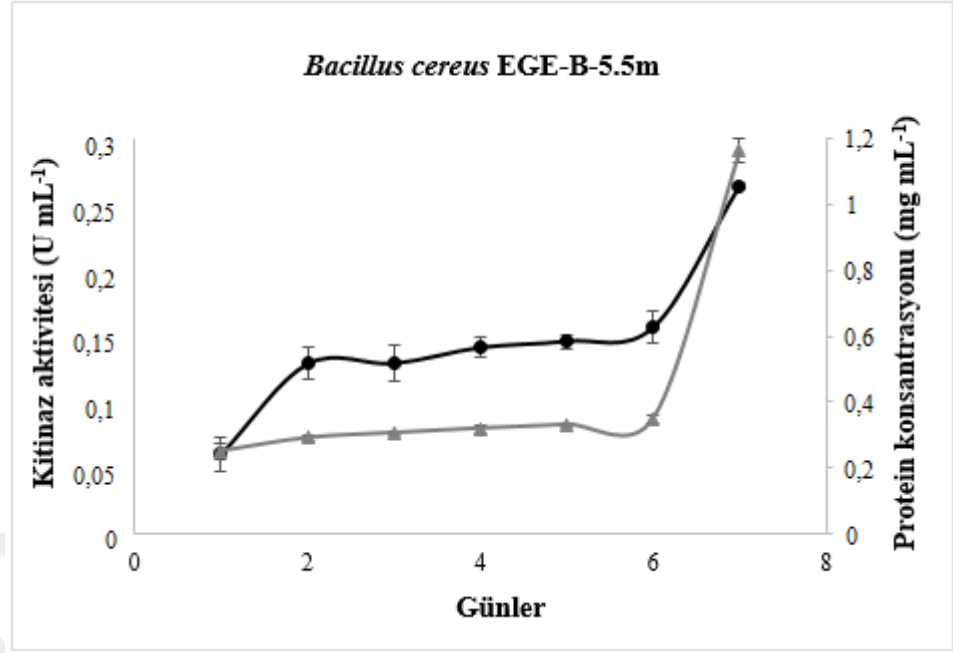


B

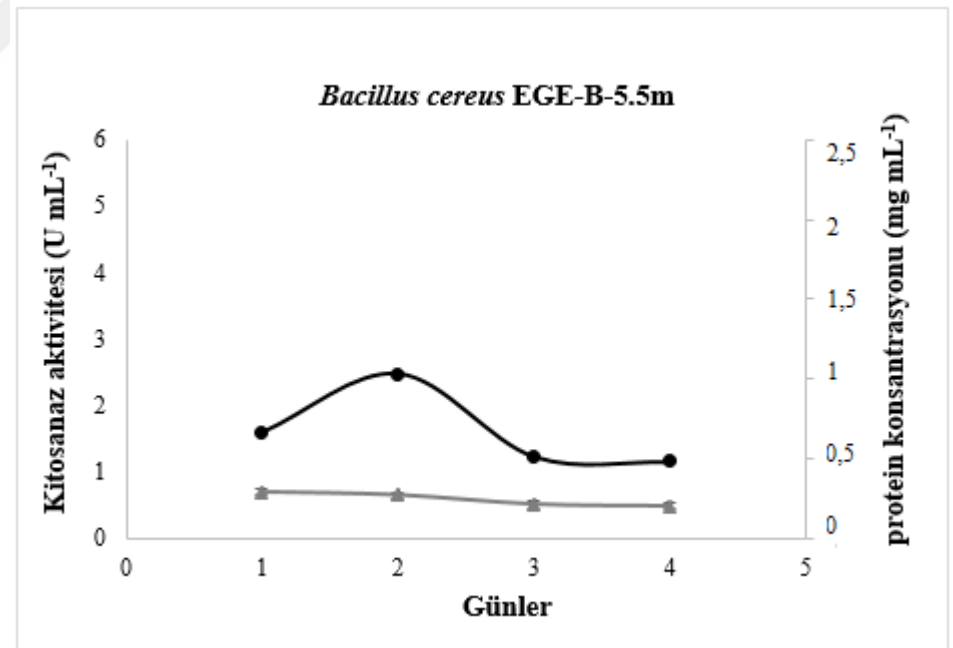


Şekil 4.9. Farklı günlerde *Bacillus mycoides* EGE-B-44.1 suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

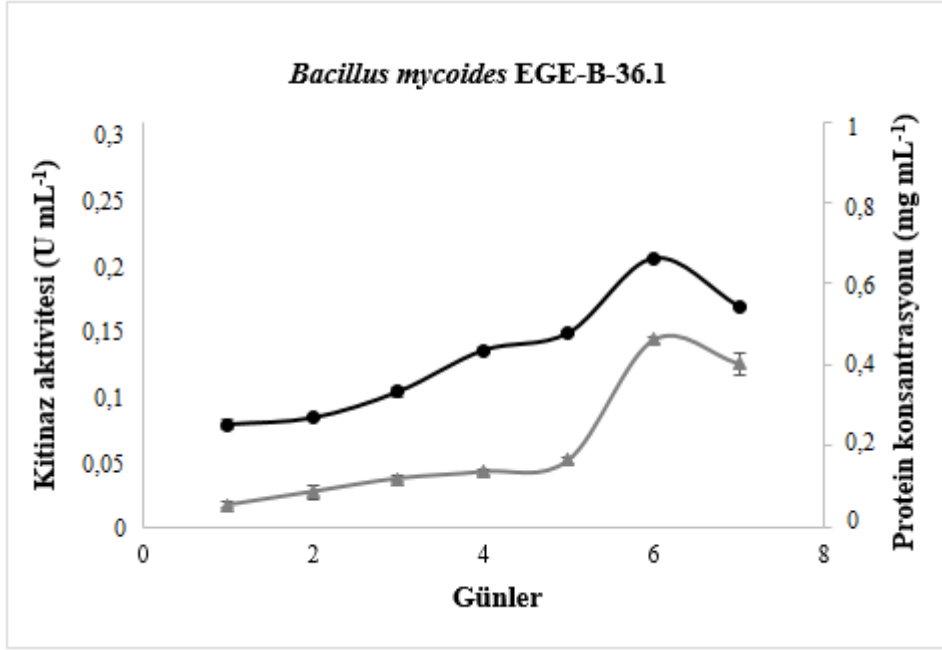


B

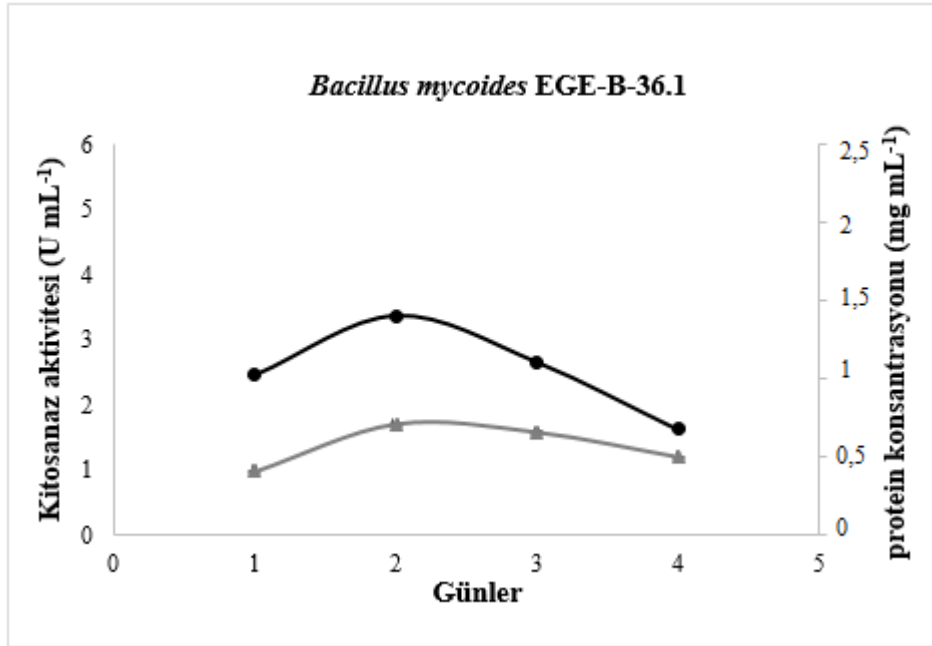


Şekil 4.10. Farklı günlerde *Bacillus cereus* EGE-B-5.5m suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

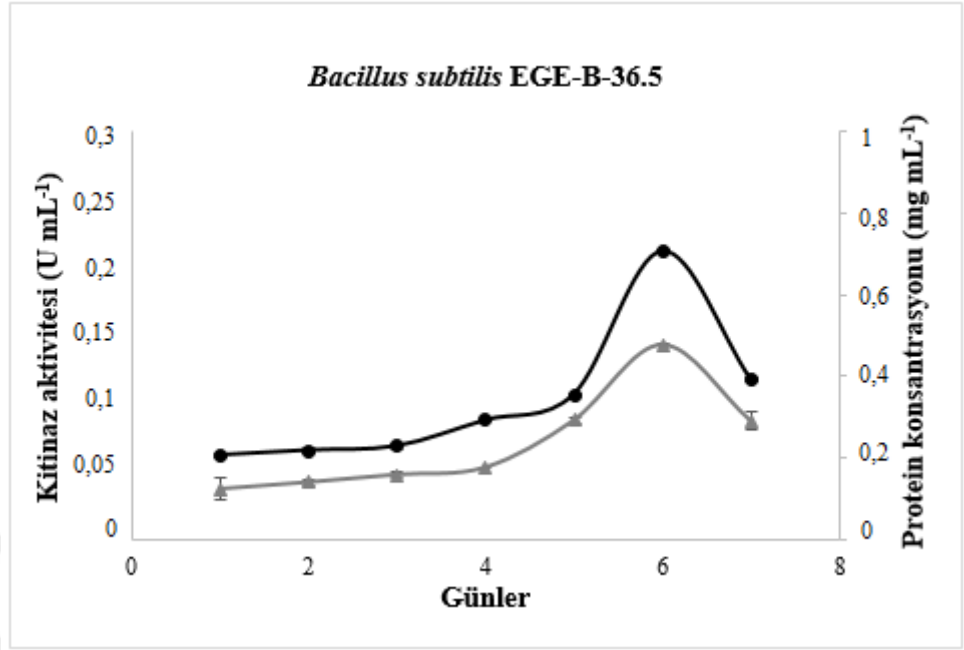


B

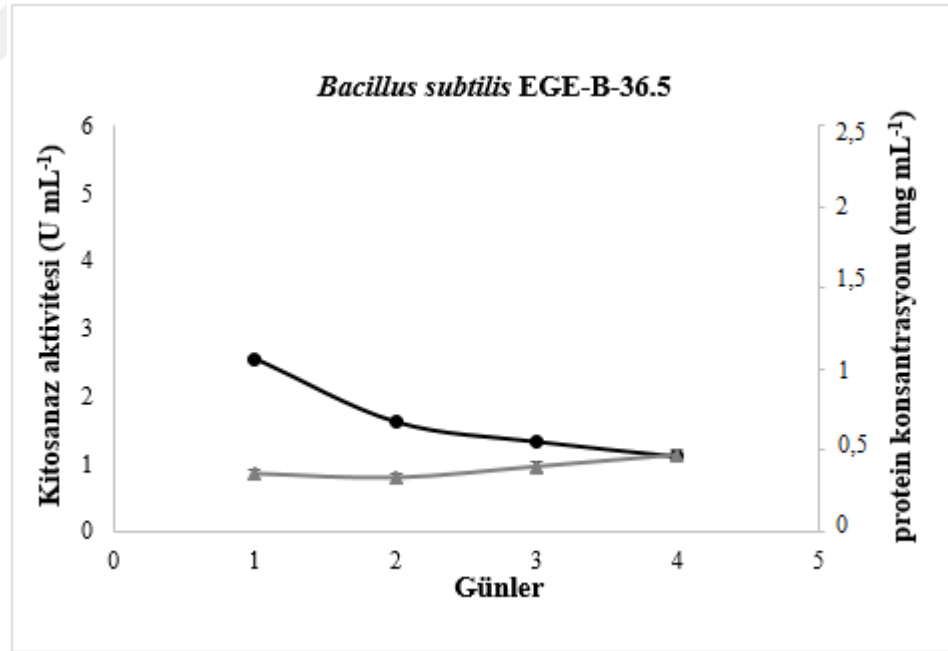


Şekil 4.11. Farklı günlerde *Bacillus mycoides* EGE-B-36.1 suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

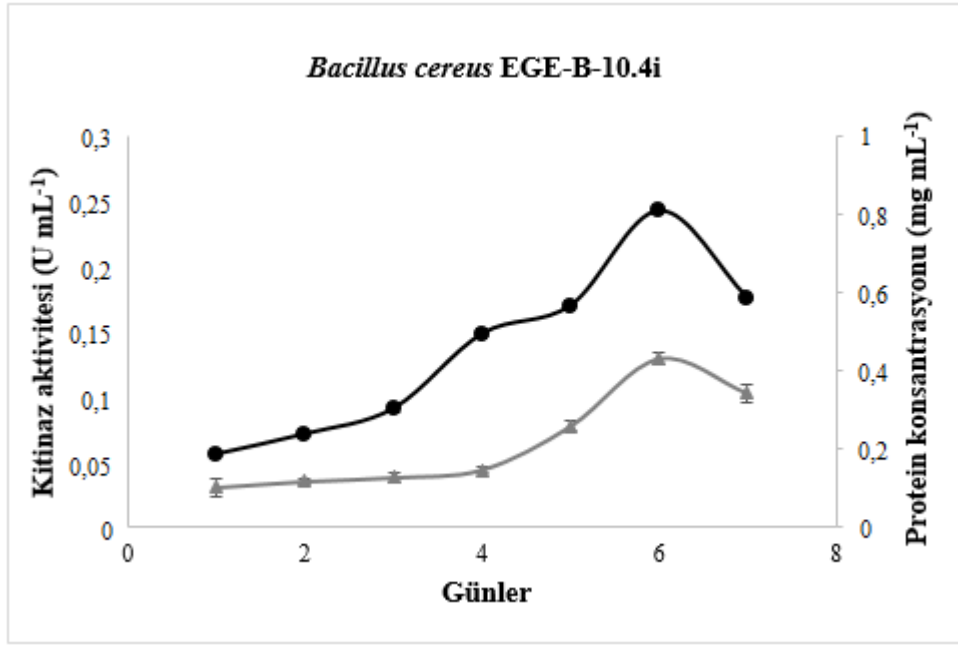


B

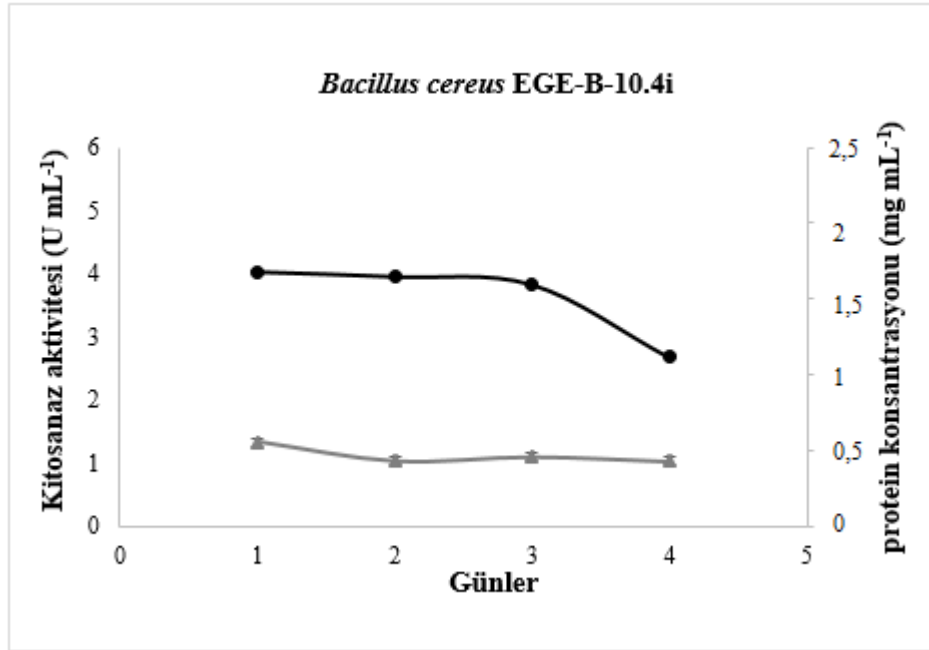


Şekil 4.12. Farklı günlerde *Bacillus subtilis* EGE-B-36.5 suşunun kiti naz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kiti sanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

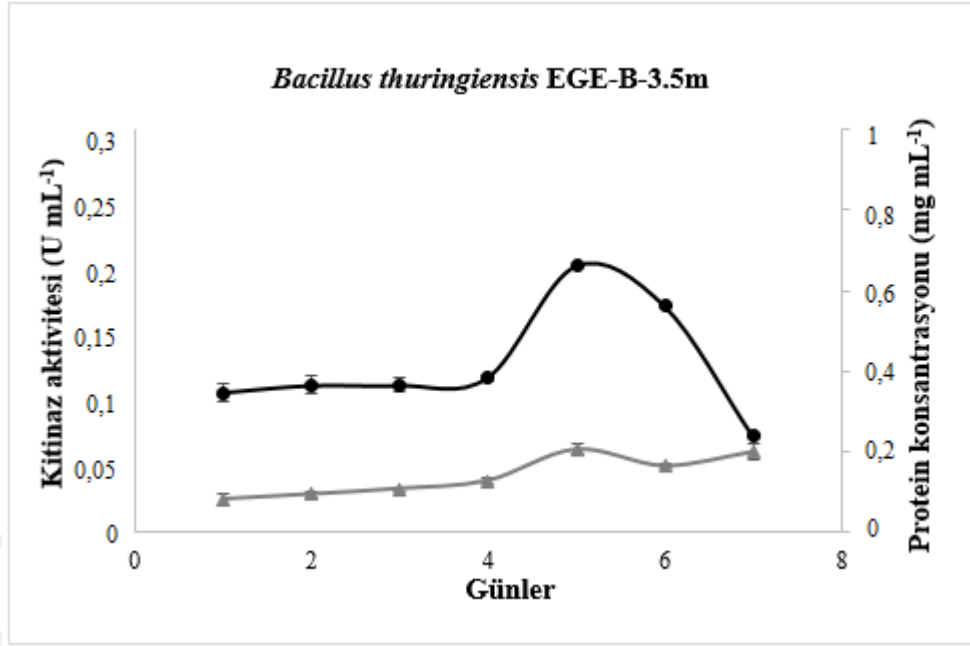


B

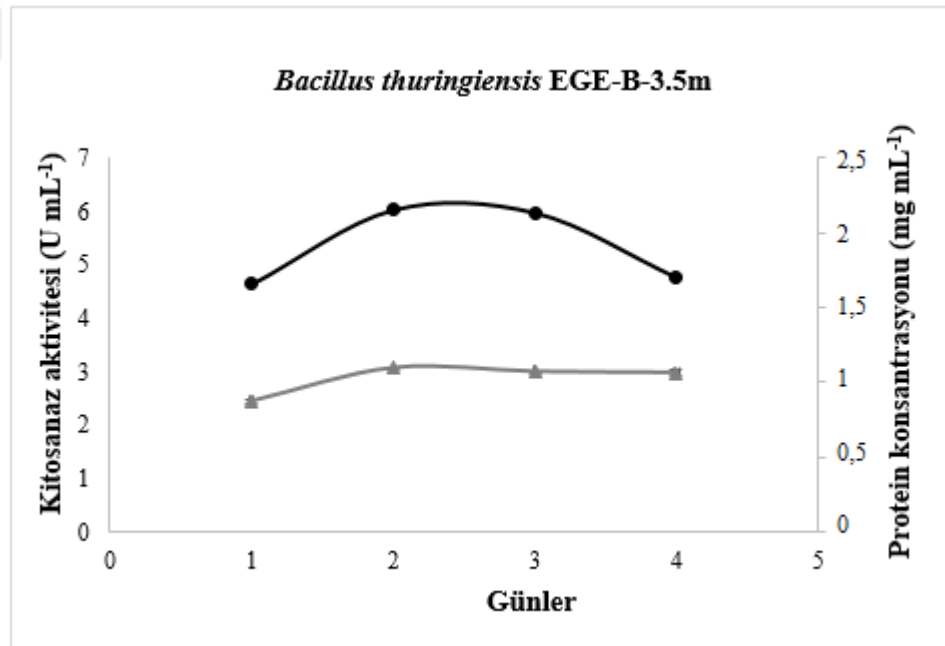


Şekil 4.13. Farklı günlerde *Bacillus cereus* EGE-B-10.4i suşun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

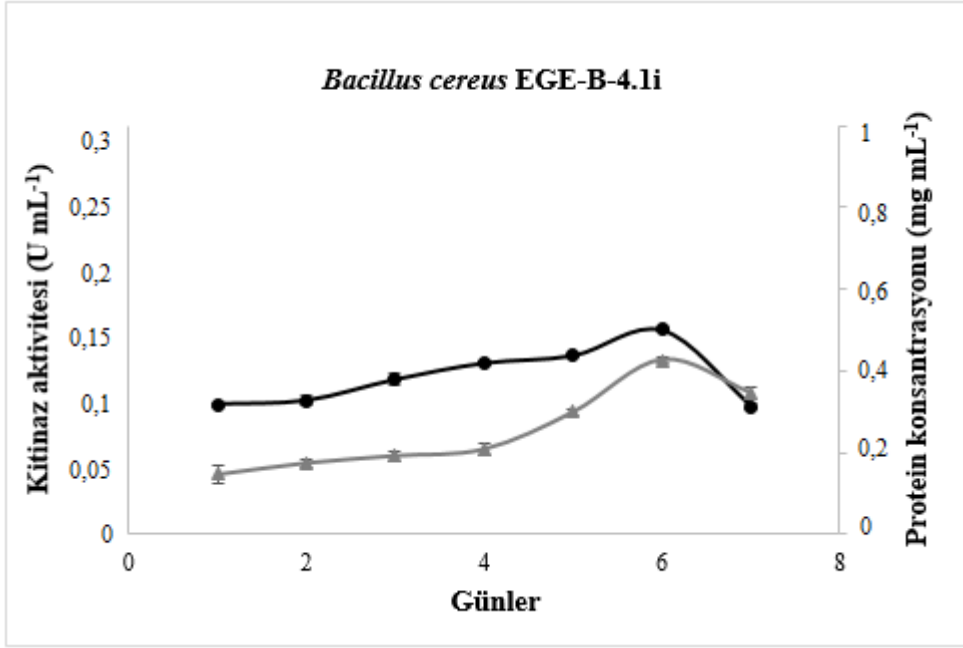


B

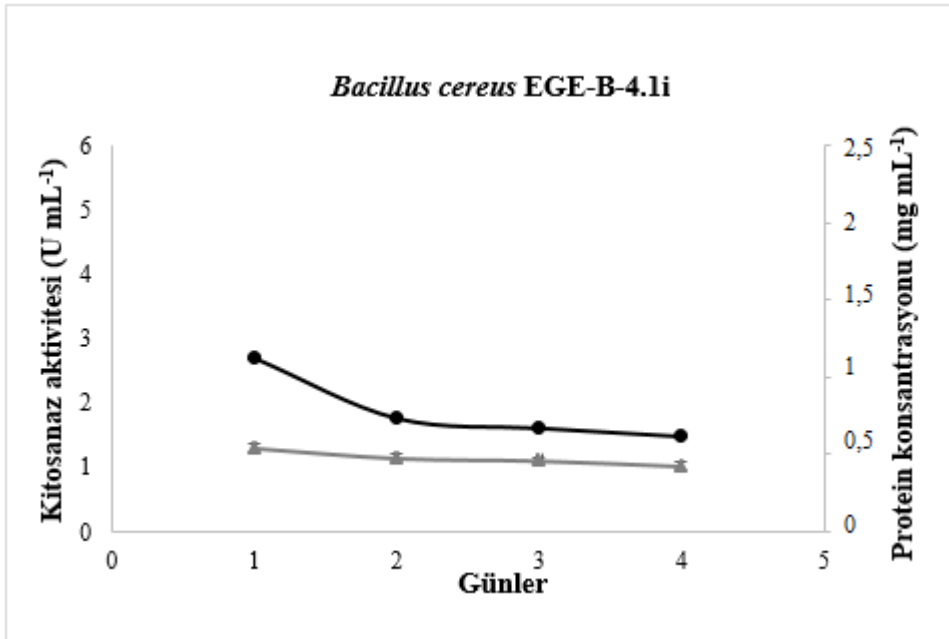


Şekil 4.14. Farklı günlerde *Bacillus thuringiensis* EGE-B-3.5m suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

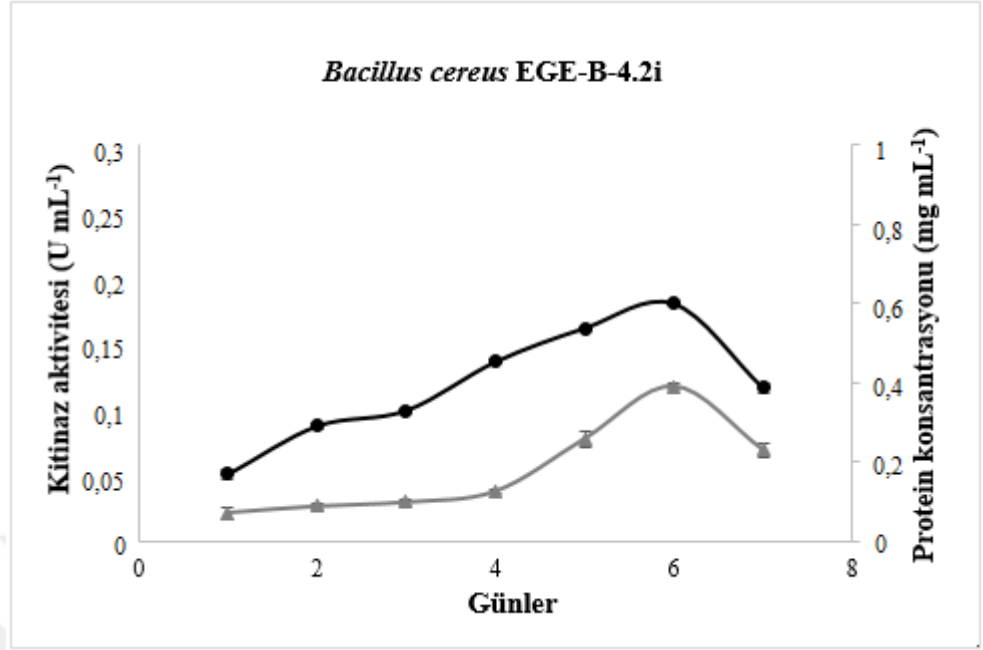


B

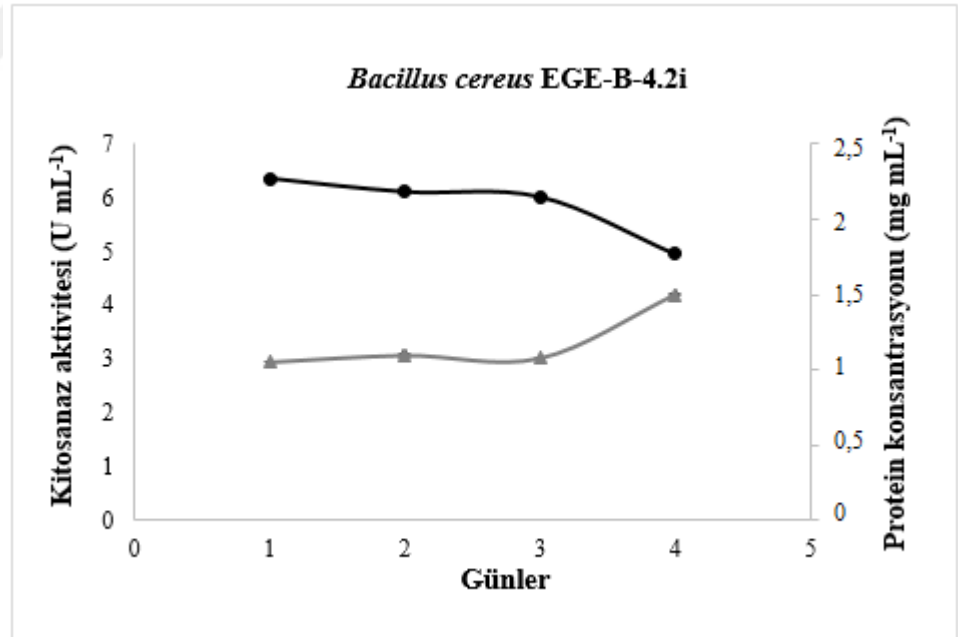


Şekil 4.15. Farklı günlerde *Bacillus cereus* EGE-B-4.1i suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

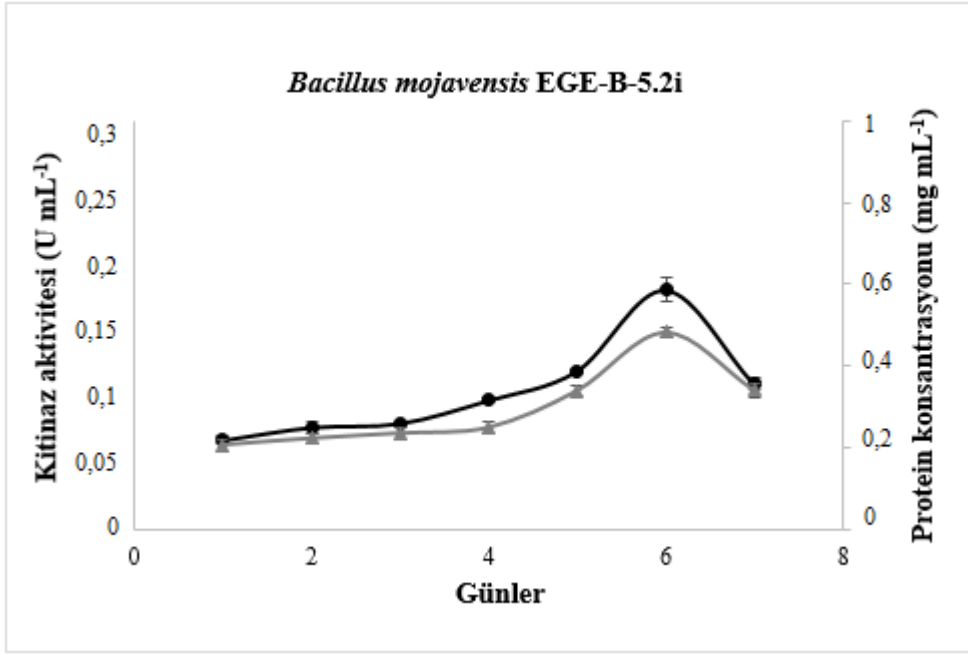


B

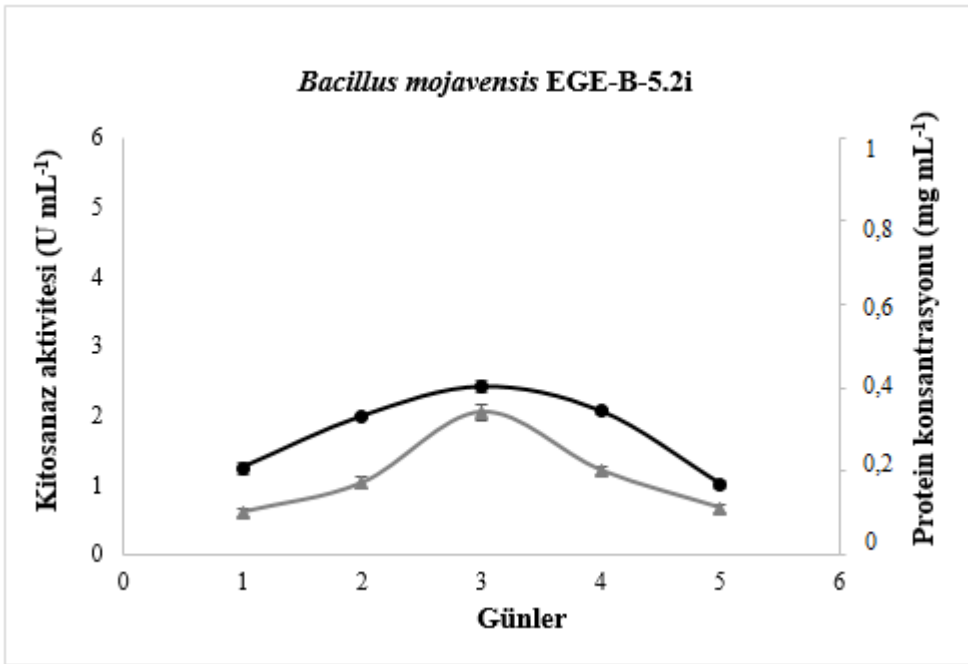


Şekil 4.16. Farklı günlerde *Bacillus cereus* EGE-B-4.2i suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A

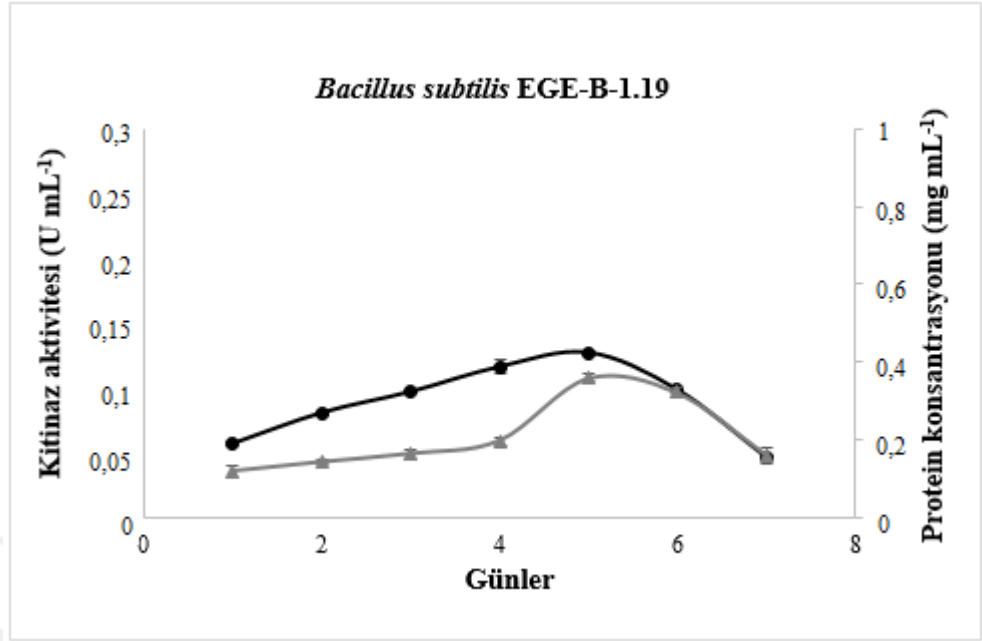


B

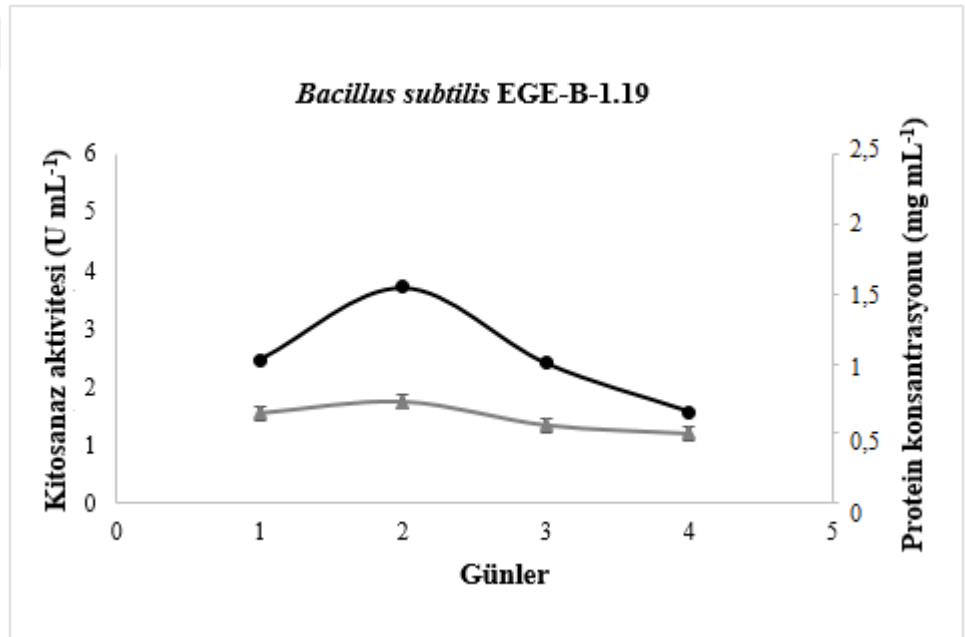


Şekil 4.17. Farklı günlerde *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

A



B



Şekil 4.18. Farklı günlerde *Bacillus subtilis* EGE-B-1.19 suşunun kitinaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (A), kitosanaz aktivitesi (●) ve protein konsantrasyonu (▲) (B).

Maksimum kitinaz ve kitosanaz aktivitelere ulaşıldığı günü belirlemek için her bir suş için enzim aktiviteleri 1-7 gün süreyle her 24 saatlik periyot sonrasında belirlenmiştir. Enzim aktiviteleri ile birlikte fermantasyon sıvısındaki

protein konsantrasyonları da belirlenmiş ve spesifik enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi ve protein miktarı kültür süpernatantından ölçülmüştür. Tüm ölçümler üçer kez alınmış, ortalamalar ve standart sapma ($\pm$ SS) hesaplanmıştır. Analiz sonuçlarının ANOVA testi ile değerlendirilmesi sonucu farklı *Bacillus* suşlarının kitinaz/kitosanaz aktiviteleri ile protein miktarları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($p \leq 0,05$) olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Bacillus* suşlarının maksimum kitinaz aktiviteleri, protein konsantrasyonları ve spesifik aktiviteleri ile optimum kültürasyon süreleri.

İzolat kodu	Tür adı	Optimum kültürasyon süresi (gün)	Kitinaz aktivitesi (U mL ⁻¹) $\pm$ SS	Protein miktarı (mg mL ⁻¹) $\pm$ SS	Spesifik Aktivite (U mg ⁻¹) $\pm$ SS
EGE-B-6.1m	<i>B. cereus</i>	5	0,23 $\pm$ 0,001	0,48 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,01
EGE-B-14.1i	<i>B. thuringiensis</i>	5	0,17 $\pm$ 0,002	0,36 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,02
EGE-B-14.7i	<i>B. thuringiensis</i>	7	0,28 $\pm$ 0,002	0,84 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,01
EGE-B-19.3	<i>B. mycoides</i>	5	0,16 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,01
EGE-B-28.2	<i>B. thuringiensis</i>	5	0,30 $\pm$ 0,001	0,48 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,01
EGE-B-2.5m	<i>B. cereus</i>	6	0,16 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,004	0,31 $\pm$ 0,01
EGE-B-44.1	<i>B. mycoides</i>	6	0,13 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,002	0,30 $\pm$ 0,001
EGE-B-5.5m	<i>B. cereus</i>	7	0,26 $\pm$ 0,002	1,16 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,03
EGE-B-36.1	<i>B. mycoides</i>	6	0,20 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,01
EGE-B-36.5	<i>B. subtilis</i>	6	0,21 $\pm$ 0,001	0,48 $\pm$ 0,004	0,45 $\pm$ 0,04
EGE-B-10.4i	<i>B. cereus</i>	6	0,24 $\pm$ 0,001	0,43 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,07
EGE-B-3.5m	<i>B. thuringiensis</i>	5	0,20 $\pm$ 0,001	0,21 $\pm$ 0,004	0,96 $\pm$ 0,06
EGE-B-4.1i	<i>B. cereus</i>	6	0,15 $\pm$ 0,001	0,43 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01
EGE-B-4.2i	<i>B. cereus</i>	6	0,18 $\pm$ 0,002	0,39 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,01
EGE-B-5.2i	<i>B. mojavensis</i>	6	0,18 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,02
EGE-B-1.19	<i>B. subtilis</i>	5	0,13 $\pm$ 0,002	0,36 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01

SS; standart sapma

Kitinazlar, çözünmeyen kitini çözünür bir forma dönüştürmek için gerekli enzimlerdir ve pek çok bakteri türü, kitin kullanımı için kitinaz sentezlemektedir (Woo and Park, 2003). Çalışmamızda, *Bacillus* suşlarının kitinaz aktiviteleri 0,13 $\pm$ 0,01 - 0,30 $\pm$ 0,001 U mL⁻¹ aralığında ve spesifik aktiviteler 0,23 $\pm$ 0,03 - 0,96 $\pm$ 0,06 U mg⁻¹ aralığında bulunmuştur (Çizelge 4.1). Literatüre göre, farklı

Bacillus suşların kitinaz aktiviteleri 0,4-16,6 U mg⁻¹ aralığında değişmektedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Literatürde bildirilen farklı *Bacillus* spp'nin kitinaz aktiviteleri.

<i>Bacillus</i> spp.	Kitinaz aktivitesi (U mg ⁻¹)	Aktivite ölçüm metodu	Referans
<i>Bacillus</i> sp. WY22	0,4	Schales metodu (37°C)	(Woo and Park, 2003)
<i>Bacillus</i> sp. Hu1	11,1	DNS metodu (60°C)	(Dai et al., 2011)
<i>B. thuringiensis</i> ve <i>B. licheniformis</i>	1,28 and 1,20 (U mL ⁻¹)	Değiştirilmiş DNS metodu (60°C)	(Gomaa, 2012)
<i>B. cereus</i> TKU028	16,598	Schales metodu (37°C)	(Liang et al., 2014b)
<i>B. subtilis</i> TV-125A	6,95	Schales metodu (37°C)	(Senol et al., 2014)
<i>B. licheniformis</i> S213	0,19 (U mL ⁻¹)	DNS metodu (50°C)	(Slimene et al., 2015)
<i>Bacillus</i> spp.	0,23 – 0,96	Schales metodu (37°C)	Bu çalışma (Çizelge 4.1)

Çizelge 4.3. *Bacillus* suşlarının maksimum kitosanaz aktiviteleri, protein konsantrasyonları ve spesifik aktiviteleri ile optimum kültürasyon süresi.

İzolat kodu	Tür adı	Optimum kültürasyon süresi (gün)	Kitosanaz aktivitesi (U mL ⁻¹)±SS	Protein miktarı (mg mL ⁻¹)±SS	Spesifik Aktivite (U mg ⁻¹)±SS
EGE-B-6.1m	<i>B. cereus</i>	3	4,81±0,02	1,86±0,03	2,59±0,13
EGE-B-14.1i	<i>B. thuringiensis</i>	1	2,69±0,02	1,10±0,01	2,46±0,06
EGE-B-14.7i	<i>B. thuringiensis</i>	3	5,16±0,02	1,20±0,01	4,31±0,71
EGE-B-19.3	<i>B. mycoides</i>	3	4,33±0,02	1,12±0,01	3,86±0,05
EGE-B-28.2	<i>B. thuringiensis</i>	3	4,53±0,01	0,79±0,02	5,74±0,11
EGE-B-2.5m	<i>B. cereus</i>	2	4,59±0,02	1,08±0,02	4,24±0,05
EGE-B-44.1	<i>B. mycoides</i>	1	4,71±0,01	1,11±0,05	4,26±0,08
EGE-B-5.5m	<i>B. cereus</i>	2	2,48±0,01	0,29±0,02	8,52±0,14
EGE-B-36.1	<i>B. mycoides</i>	2	3,37±0,02	0,71±0,02	4,75±0,03
EGE-B-36.5	<i>B. subtilis</i>	1	2,56±0,01	0,35±0,01	7,22±0,4
EGE-B-10.4i	<i>B. cereus</i>	1	4,03±0,01	0,56±0,01	7,25±0,02
EGE-B-3.5m	<i>B. thuringiensis</i>	2	6,03±0,02	1,10±0,01	5,51±0,14
EGE-B-4.1i	<i>B. cereus</i>	1	2,69±0,01	0,54±0,02	4,97±0,03
EGE-B-4.2i	<i>B. cereus</i>	1	6,36±0,01	1,05±0,002	6,03±0,06
EGE-B-5.2i	<i>B. mojavensis</i>	3	2,41±0,02	0,34±0,02	7,17±0,17
EGE-B-1.19	<i>B. subtilis</i>	2	3,71±0,02	0,72±0,01	5,13±0,05

SS; standart sapma

Kitosanazlar bakteri, mantar, virüs ve bitkiler gibi çeşitli organizmalarda bulunmaktadır. Bakteriyel genuslar arasında *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Myxobacter*, *Enterobacter*, *Streptomyces* ve *Nocardia*'nın kitosanaz üreten suşlara sahip oldukları belirtilmiştir (Muslim et al., 2016). Bu çalışmada *Bacillus* suşlarının $2,41 \pm 0,02$ - $6,36 \pm 0,01$ U mL⁻¹ aralığında önemli miktarda kitosanaz ürettiği ve $2,46 \pm 0,06$ - $8,52 \pm 0,14$ U mg⁻¹ aralığında spesifik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 4.3). Literatüre göre, *Bacillus* spp.'nin kitosanaz aktiviteleri, 0,024 ila 435 U mg⁻¹ arasında değişmektedir (Çizelge 4.4). Enzim aktivitelerindeki farklılık, *Bacillus* suşlarının enzim üretim yetenekleri arasındaki farka ve kısmen aktivite ölçümü için farklı yöntemlerin kullanımına atfedilebilir.

Çizelge 4.4. Literatürde bildirilen farklı *Bacillus* spp'nin kitosanaz aktiviteleri.

<i>Bacillus</i> spp.	Kitosanaz aktivitesi (U mg ⁻¹)	Aktivite ölçüm metodu	Referans
<i>B. cereus</i> S1	53	DNS metodu (40°C)	(Kurakake et al., 2000)
<i>B. subtilis</i> IMR-NK1	435	Schales metodu (37°C)	(Chiang et al., 2003)
<i>Bacillus</i> sp. KCTC 0377BP	72	DNS metodu (50°C)	(Choi et al., 2004)
<i>B. licheniformis</i> MB-2	1,49	Schales metodu (70°C)	(Ekowati et al., 2006)
<i>Bacillus</i> sp. S65	8	DNS metodu (37°C)	(Su et al., 2006)
<i>B. cereus</i> D-11	39,3	Schales metodu (37°C)	(Gao et al., 2008)
<i>B. subtilis</i> RKY3	5,63 (U mL ⁻¹)	DNS metodu (60°C)	(Wee et al., 2009)
<i>B. thuringiensis</i> JAM-GG01	17,1	DNS metodu (50°C)	(Kobayashi et al., 2011)
<i>B. cereus</i> TKU022	0,024	Schales metodu (37°C)	(Liang et al., 2012)
<i>Bacillus</i> spp.	2,46 – 8,52	DNS metodu (50°C)	Bu çalışma (Çizelge 4.3)

4.2 Kitosanaz Üretiminin Optimizasyonu

B. mojavensis ile ilgili şimdiye kadar çok sınırlı literatürün mevcut olması ve daha önce *B. mojavensis*'in ksilanaz (Akhavan Sepahy et al., 2011; Ghazala et al., 2016), proteaz (Beg and Gupta, 2003), α -amilaz (Haddar et al., 2012) ve pektinaz (Ghazala et al., 2015) gibi birkaç değerli endüstriyel enzimi ürettiği bildirilmiş olmasına karşılık kitosanaz üretim kapasitesi daha önce bildirilmemiştir. Bu nedenle çalışmamızda *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i, kitosanaz üretimi optimizasyonu ve enzim saflaştırması için seçilmiştir.

4.2.1 Optimum karbon ve azot kaynağının belirlenmesi

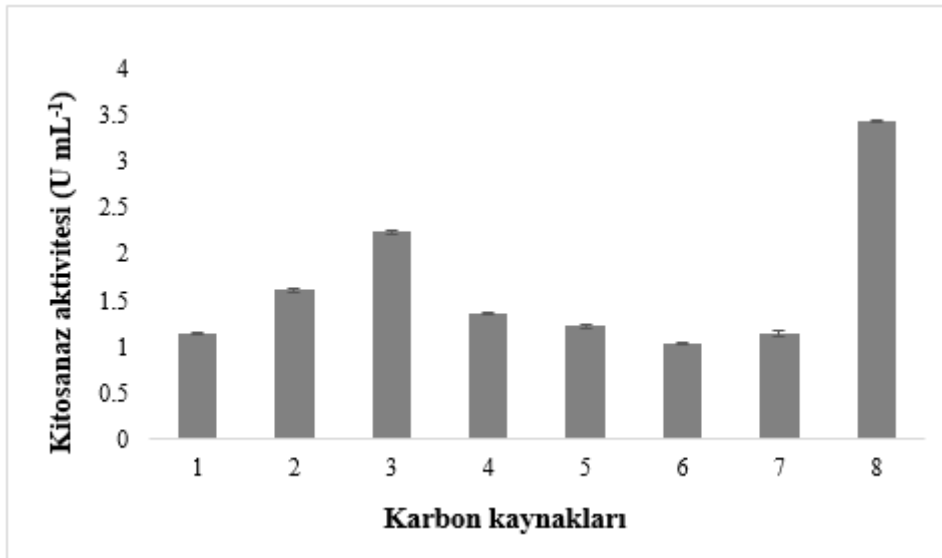
Karbon kaynağı, azot kaynağı, inorganik tuzlar, sıcaklık, pH, inkübasyon süresi ve çalkalama hızı gibi çeşitli kültürasyon parametreleri doğrudan kitosanaz üretimini etkileyebilmektedir (Zhang et al., 2012a). Mevcut çalışmada, kitosanaz üretimini iyileştirmek amacıyla, farklı karbon ve azot kaynakları, tek değişkenli bir yaklaşımla test edilmiştir ve kitosanaz aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Karbon kaynaklarının taranması deneylerinde, toz kitosan, koloidal kitosan, çözünür kitosan, toz kitin, koloidal kitin, glikoz, laktoz, melas, selüloz ve çözünür nişasta kullanılmıştır. Bu çalışmamızda tek karbon kaynağı olarak toz kitin, koloidal kitin, glikoz, laktoz, melas, selüloz ve çözünebilir nişastanın kullanıldığı denemelerin hiçbirinde kitosanaz aktivitesini tespit edilememiştir (Şekil 4.19). Kitosanaz aktivitesi, sadece kitosan esaslı karbon kaynakları (toz kitosan, koloidal kitosan ve çözünür kitosan) varlığında saptanmıştır. Farklı kitosanlar arasında koloidal kitosan enzim aktivitesi $2,24 \text{ U mL}^{-1}$ ile en iyi kitosanaz indükleyici olmuştur ve ardından çözünür kitosan ile enzim aktivitesi $1,6 \text{ U mL}^{-1}$ tespit edilmiştir. Kitosanaz aktiviteleri Çizelge 4.5'te gösterilmiştir. *B. mojavensis* tarafından üretilen kitosanazın, yalnızca kitosan esaslı karbon kaynağı varlığında üretildiği için bu sonuçlar kitosanazın indüklenebilir olduğunu ortaya koymuştur.

Çizelge 4.5. Çeşitli karbon kaynakları ve kombinasyonları ile büyütülen *B. mojavensis* EGE-B-5.2i'nin kitosanaz aktivitesi.

Karbon kaynakları ve kombinasyonları	Kitosanaz aktivitesi (U mL^{-1}) $\pm$ SS
Toz kitosan	$1,14 \pm 0,01^a$
Çözünür kitosan	$1,61 \pm 0,01$
Koloidal kitosan	$2,24 \pm 0,02$
Toz kitin	0^b
Koloidal kitin	0^b
Glikoz	0^b
Laktoz	0^b
Melas	0^b
Selüloz	0^b
Çözünür nişasta	0^b
Koloidal kitosan + Glikoz	$1,36 \pm 0,02$
Koloidal kitosan + Laktoz	$1,22 \pm 0,02^a$
Koloidal kitosan + Melas	$1,03 \pm 0,01$
Koloidal kitosan + Selüloz	$1,15 \pm 0,03^a$
Koloidal kitosan + Çözünür nişasta	$3,44 \pm 0,01$

Tüm aktivite ölçümleri üçer kez alınmış, ortalamalar ve standart sapma ($\pm$ SS) hesaplanmıştır, ANOVA testiyle *B. mojavensis* EGE-B-5.2i'nin kitosanaz aktivitesi ile farklı karbon kaynakları ve kombinasyonları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğunu gösterilmiştir ($p \leq 0,05$). Çizelge 4.5'te aynı harf ile verilen ortalamalar, bu verilerin aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığını (Tukey's testi, $p \leq 0,05$) göstermektedir.

Kolloidal kitosan ile kombinasyon halinde bir ilave karbon kaynağının kullanılması, enzim aktivitesini arttırmak için faydalı olduğu ve eklenen karbon kaynağının başlangıç periyodunda bakteri üremesine yardımcı olduğu gözlemlenmiştir. Bazı önceki çalışmalarda, basit bir karbon kaynağının kitosan esaslı substratlar ile birleştirilerek kitosanaz üretiminin arttırılmasındaki etkinliğini belirtmiştir (Sun et al., 2007; Zhang and Zhang, 2013). Bu nedenle, çalışmamızda kolloidal kitosan ile birlikte glikoz, laktoz, melas, selüloz ve çözünebilir nişastayı içeren farklı karbon kaynaklarının etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, kolloidal kitosana kıyasla ($2,24 \text{ U mL}^{-1}$) yalnızca kolloidal kitosan ve çözünebilir nişasta kombinasyonu ile iyileştirilmiş kitosanaz üretimi ($3,44 \text{ U mL}^{-1}$) elde edilmesine karşılık, diğer kombinasyonların kitosanaz üretimini arttırmadığı ortaya konmuştur (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Çeşitli karbon kaynakları ve kombinasyonları ile büyütülen *B. mojavensis* EGE-B-5.2i'nin kitosanaz aktivitesi. 1- toz kitosan, 2- çözünür kitosan, 3- kolloidal kitosan, 4- kolloidal kitosan+glikoz, 5- kolloidal kitosan+laktoz, 6- kolloidal kitosan+melas, 7- kolloidal kitosan+selüloz, 8- kolloidal kitosan+çözünür nişasta.

Çözünür nişastanın daha önce kitosanaz üretiminde *Bacillus* spp. için en iyi karbon kaynağı olduğu kanıtlanmıştır, ancak ortamda kitosan esaslı bir substrat kitosanaz indükleyicisi olarak kullanılmamıştır. (Choi et al., 2004). Çalışmamızda da çözünür nişastanın koloidal kitosan ile kombinasyon halinde kullanılmasıyla kitosanaz üretimini iyileştirmek için yararlı olduğu saptanmıştır. Basit şekerlerin, karides kabuğu tozu ile kombinasyon halinde, kitosanaz üretmek üzere test edildiği bir başka araştırmada çözünür nişastanın, karides kabuğu tozu ile birlikte, kitosanaz üretimi için ikinci en iyi kombinasyon olduğu bildirilmiştir (Zhang and Zhang, 2013).

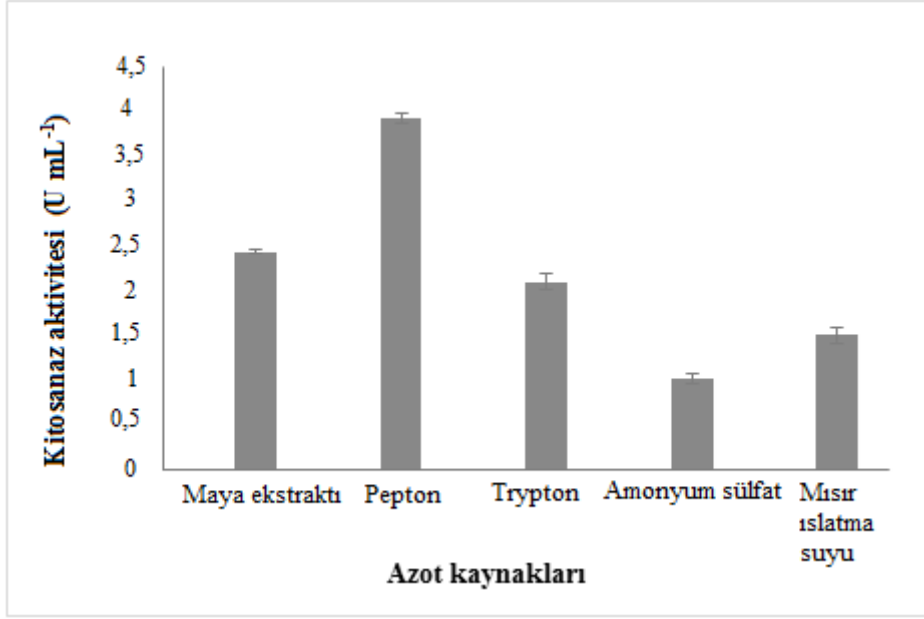
Çalışmamızda en iyi karbon kaynağını seçtikten sonra, çeşitli azot kaynakları (maya ekstraktı, pepton, tripton, amonyum sülfat ve mısır ıslatma sıvısı (CSL) test edilmiştir ve pepton ile diğer test edilen azot kaynaklarına göre maksimum kitosanaz üretimi ($3,93 \text{ U mL}^{-1}$) elde edilmiştir. Tüm aktivite ölçümleri üçer kez alınmış, ortalamalar ve standart sapma ($\pm$ SS) hesaplanmıştır, kitosanaz aktiviteleri Çizelge 4.6 ve Şekil 4.20’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Çeşitli azot kaynakları ile büyütülen *B. mojavensis* EGE-B-5.2i’nin kitosanaz aktivitesi.

Azot kaynakları	Kitosanaz aktivitesi (U mL^{-1}) $\pm$ SS
Maya ekstraktı	$2,44 \pm 0,03^a$
Pepton	$3,93 \pm 0,04$
Tripton	$2,11 \pm 0,05^a$
Amonyum sülfat	$1,03 \pm 0,035$
Mısır ıslatma sıvısı	$1,51 \pm 0,04$

SS; standart sapma

ANOVA testiyle *B. mojavensis* EGE-B-5.2i’nin kitosanaz aktivitesi ile farklı azot kaynaklarının kullanımı arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğunu ($p \leq 0,05$) gösterilmiştir. Çizelge 4.6’te aynı harf ile verilen ortalamalar, bu verilerin aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığını (Tukey’s testi, $p \leq 0,05$) göstermektedir.



Şekil 4.20. Çeşitli azot kaynakları ile büyütülen *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2'nin kitosanaz aktivitesi (U mL⁻¹).

Kitosanaz üretimi için kompleks organik azot kaynakları, inorganik azot kaynağından daha üstün bulunmuştur. Bunun nedeni organik azot kaynaklarının bakteri üremesi için gerekli çeşitli büyüme faktörleri ve amino asitleri içermesidir. Maya ekstraktı, et ekstraktı ve pepton gibi organik azot kaynaklarının, birçok araştırmacı tarafından kitosanaz üretimi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Chen et al., 2011; Choi et al., 2004; Wee et al., 2009).

4.2.2 Plackett Burman (PB) tasarımıyla önemli değişkenlerin seçimi

Fermantasyon ortamını optimize etmek için, klasik yöntemler iki veya daha fazla faktörün etkileşimlerini tanımlayamadığı için istatistiksel yöntemler klasik yöntemlere kıyasla önem kazanmaktadır. İstatistiksel yöntemler, minimum sayıda deney ile çeşitli değişkenleri değerlendirmek ve tatmin edici sonuçlar için yeterli veri sağlamak için yararlıdır. RSM, en az sayıda deney gerçekleştirerek çok değişkenli istatistiksel optimizasyon için etkili bir tekniktir (Mustafa et al., 2016; Zhang et al., 2012). Bu teknik, besi ortam bileşimlerini, enzimatik hidroliz koşullarını, fermantasyon işlemlerini ve gıda üretim işlemlerini optimize etmek için etkili bir şekilde kullanılmıştır (Raji et al., 2009). Bu nedenle, RSM, daha önce tatmin edici sonuçlar sergilediği için çeşitli biyoproseslerde iyi kurulmuş bir metodolojidir (Cheng et al., 2012; da Silva et al., 2012; Wee et al., 2009).

PB tasarım, bir deneyde çoklu değişkenlerin taranması için basit ve hızlı bir yöntemdir ve fermentasyon süreci ve enzim üretimini etkileyen en önemli değişkenlerin değerlendirilmesi için sıklıkla kullanılmıştır. İlk tarama deneylerimizden sonra, diğer besi ortam bileşenlerinin optimizasyonu istatistiksel deneyler ve PB tasarım ile gerçekleştirilmiştir. On bir değişken (koloidal kitosan, çözünür nişasta, pepton, CSL, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , FeSO_4 , MgSO_4 , KCl , NaCl , CaCl_2), için PB tasarım matrisi, deneysel ve öngörülen yanıtlarla birlikte bunların düzeyleri (g L^{-1}) Çizelge 4.7'de gösterilmektedir. PB deneyleri, yüksek enzim üretimine ulaşmak için besi ortamın optimizasyonun önemini yansıtan, kitosanaz üretiminde 2.3 ila 9.3 U mL^{-1} arasında geniş bir varyasyon göstermiştir.

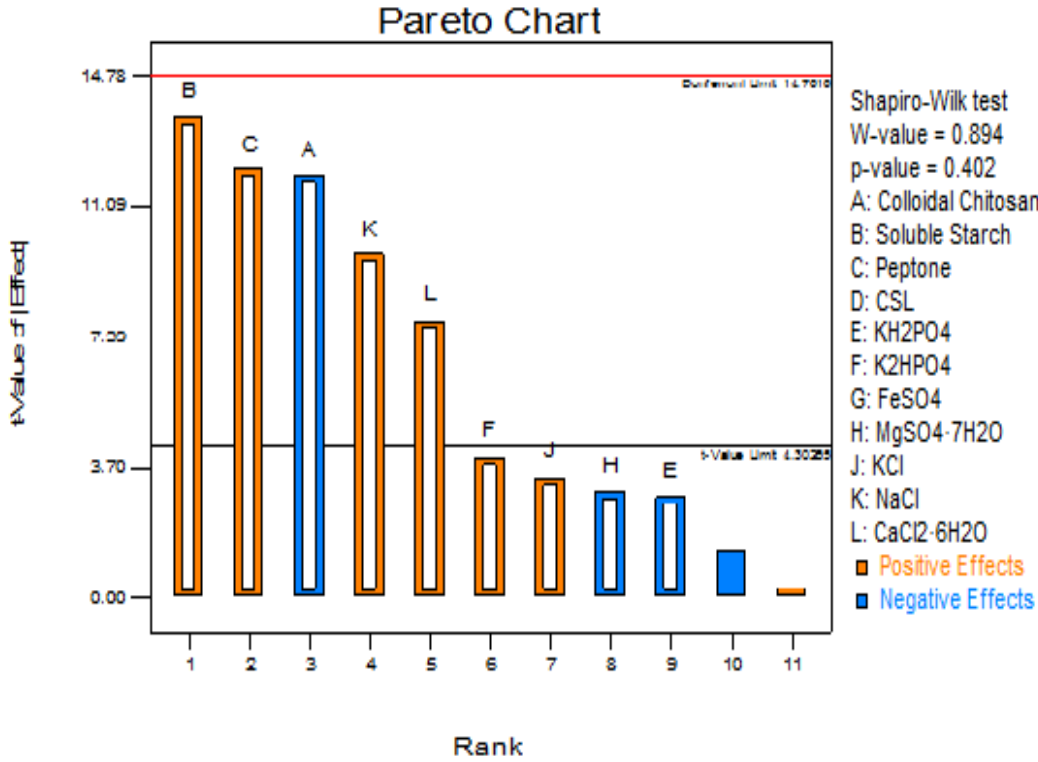
Çizelge 4.7. On bir değişken ve bunların düzeyleri için dizayn Plackett Burman matrisi ile kitosanaz aktivitesinin tahmin ve deneysel değerleri.

No	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	Kitosanaz aktivitesi (U mL^{-1})	
												Deneysel	Tahmini
1	2	1	1	1	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	2,30	2,33
2	20	10	1	1	0,5	5	0,2	2	2	0,2	2	4,80	4,83
3	2	1	10	1	5	5	0,2	2	2	2	0,2	6,50	6,53
4	20	1	10	10	5	0,5	0,2	0,2	2	0,2	2	3,60	3,63
5	20	10	1	10	5	5	0,2	0,2	0,2	2	0,2	4,30	4,33
6	2	10	10	10	0,5	0,5	0,2	2	0,2	2	2	9,30	9,33
7	2	10	10	1	5	5	2	0,2	0,2	0,2	2	8,60	8,58
8	20	1	1	1	5	0,5	2	2	0,2	2	2	2,30	2,28
9	2	10	1	10	5	0,5	2	2	2	0,2	0,2	4,10	4,08
10	2	1	1	10	0,5	5	2	0,2	2	2	2	6,60	6,58
11	20	10	10	1	0,5	0,5	2	0,2	2	2	0,2	7,20	7,18
12	20	1	10	10	0,5	5	2	2	0,2	0,2	0,2	2,30	2,28

A-koloidal kitosan (g L^{-1}), B-çözünür nişasta (g L^{-1}), C-Pepton (g L^{-1}), D-CSL (g L^{-1}), E- KH_2PO_4 (g L^{-1}), F- K_2HPO_4 (g L^{-1}), G- FeSO_4 (g L^{-1}), H- MgSO_4 (g L^{-1}), J- KCl (g L^{-1}), K- NaCl (g L^{-1}), L- CaCl_2 (g L^{-1}).

Pareto grafiği, her değişkenin kitosanaz üretimine olan etkisini göstermektedir ve burada, koloidal kitosan, CSL, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ gibi dört faktörün, kitosanaz üretimini olumsuz etkilediği, diğer yedi faktörün ise

pozitif yönde etkilediği görülmektedir (Şekil 4.21). Pareto grafiği aynı zamanda önemli etkilerin sıralamasını göstermektedir ve en önemli etkiler genellikle grafikte verilen kırmızı renkli referans çizgisinden daha yakın olmaktadır. Sonraki optimizasyon deneyleri için olumlu etki gösteren değişkenler yüksek konsantrasyonda ayarlanmış ve negatif etki gösteren değişkenler düşük konsantrasyonda sabitlenmiştir. Katkının yüzdesi temelinde en önemli faktör olarak çözünür nişasta, kolloidal kitosan, pepton ve NaCl saptanmıştır.



Şekil 4.21. Bağımsız değişkenlerin kitosanaz aktivitesine etkilerini gösteren pareto grafiği.

PB tasarım ve ANOVA sonuçları ile birlikte regresyon analizinin tüm faktörlerin katkı yüzdesi Çizelge 4.8'da verilmiştir. 0,0262'lik P değeri bireysel parametrelerle birlikte modelin önemini göstermektedir ve burada P-değeri (0,05'den düşük) modeli %95 güven düzeyinde anlamlı olduğunu düşündürür. İstatistiksel analiz temelinde, çözünür nişasta, kolloidal kitosan, pepton ve NaCl en önemli değişkenler olarak kanıtlanmış ve ileri optimizasyon için seçilmiştir.

Çizelge 4.8. Kitosanaz üretimi için PB tasarımının regresyon analizi.

Kaynak	Karelerinin toplamı	% katkısı	Katsayı Tahmini	F Değeri	p-değeri Prob > F	Anlamlılık
Model	65,96			879,49	0,0262	Anlamlı
A	13,87	21,02	-1,08	1849,0	0,0148	
B	18,01	27,30	1,23	2401,0	0,0130	
C	14,30	21,68	1,09	1906,78	0,0146	
D	0,19	0,28	-0,12	25	0,1257	
E	0,80	1,21	-0,26	106,78	0,0614	
F	1,54	2,34	0,36	205,44	0,0443	
H	0,91	1,38	-0,28	121	0,0577	
G	7,500E-003	0,011	0,025	-	-	
J	1,14	1,73	0,31	152,11	0,0515	
K	9,19	13,93	0,88	1225	0,0182	
L	6,02	9,13	0,71	802,78	0,0225	

$R^2 = 0,9999$, düzeltilmiş $R^2 = 0,9987$, tahmin edilen $R^2 = 0,9836$, varyans katsayısı = %1,68.

4.2.3 Merkezi Kompozit Tasarımı (CCD) ile değişkenlerin seviye optimizasyonu

PB tasarımı etkili faktörleri belirlemek için etkilidir ancak önemli değişkenlerin karşılıklı etkileşimlerini incelemek için optimum değerlerinin belirlenmesine gereklidir ve CCD, her bir faktör için kesin optimal değerleri belirlemek için yararlı bir araçtır. CCD için yüksek ve düşük seviyeleri faktörlerin pozitif ve negatif etkileri temel alınarak seçilmiştir. Seçilen dört değişken, sembolleri, konsantrasyonları ve seviyeleri Çizelge 4.9'de verilmiştir. Diğer ortam bileşenlerinin konsantrasyonları 5 g L⁻¹ K₂HPO₄, 0.5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 2 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 2 g L⁻¹ KCL ve 2 g L⁻¹ CaCl₂ olarak ayarlanmıştır.

Çizelge 4.9 CCD için, $\alpha \pm 2$ dahil olmak üzere düşük, orta ve yüksek değerleri.

Bağımsız değişken	Sembol Kodları	Aralık	Değişkenlerin düzeyleri				
			- α	-1	0	+1	+ α
Çözünür nişasta (g L ⁻¹)	X_1	5 – 10	2,5	5	7,5	10	12,5
Kolloidal kitosan (g L ⁻¹)	X_2	5 - 8	3,5	5	6,5	8	9,5
Peptone (g L ⁻¹)	X_3	5 - 10	2,5	5	7,5	10	12,5
NaCl (g L ⁻¹)	X_4	2 - 5	0,5	2	3,5	5	6,5

Dört faktör için beş aşamalı CCD matrisi ve 30 denemeler için deneysel ve öngörülen değerleri Çizelge 4.10'de sunulmuştur. Model yeterliliği, ANOVA kullanılarak kontrol edilmiştir ve sonuçlar modelin anlamlı olduğunu göstermiştir. Kareler toplamı, ortalama, F-değeri ve P-değeri Çizelge 4.11'da verilmiştir. P değeri, her parametrenin ve modelin önemini belirtir, burada modelin P-değeri <0,0001'dir ve bu, modelin % 95 güven düzeyinde son derece anlamlı olduğunu gösterir.

F-değeri 23,29'dur ve bu büyüklüğün "Model F-Değeri"nin error bağlı olarak oluşabileceği yalnızca %0,01 oranında bir şans mevcuttur. Model, tüm doğrusal terimlerin X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , ve tüm quadric terimleri X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 , X_4^2 ile birlikte üç etkileşim terimlerinin X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 anlamlı olduğunu göstermiştir. 2,95'lik "Fit F-değerinin yetersizliği", Fit model'in anlamlı olmamasını göstermiştir. Hatanın bir sonucu olarak "Fit F-değerinin eksikliği" oluşabileceği %12,23 bir şans var.

Ayrıca, R^2 belirleme katsayısı, deneysel ve öngörülen sonuçlar arasında iyi bir uyum gösteren ve kitosanaz üretimi için modelin güvenilirliğini ima eden 0,9560 olarak bulunmuştur. Modelin Adeq Hassaslık oranı 15,183'tür, bu da kabul edilebilir bir sinyal/error oranı bulgusu anlamına gelmektedir. Seçilen değişkenlerin optimum seviyelerini ve faktörler ile tepki arasındaki ilişkiyi hesaplamak için ikinci dereceden bir polinom modeli önerilmiştir.

$$Y_1 = 18.51 + 3.45 X_1 + 1.67 X_2 - 0.70 X_3 - 0.69 X_4 + 0.98 X_1X_2 - 0.99 X_1X_3 - 0.49 X_1X_4 + 0.89 X_2X_3 - 2.50 X_1^2 - 1.30 X_2^2 - 2.46 X_3^2 - 2.27 X_4^2$$

Burada Y_1 kitosanaz aktivitesi $U \text{ mL}^{-1}$ ve X_1 , X_2 , X_3 , X_4 test değişkenlerinin kodlanmış değerleri, çözünür nişasta ($g \text{ L}^{-1}$), kolloidal kitosan ($g \text{ L}^{-1}$), pepton ($g \text{ L}^{-1}$) ve NaCl ($g \text{ L}^{-1}$)'dir.

Çizelge 4.10. Dört değişken için merkezi kompozit tasarım matrisi ve kitosanaz aktivitesinin tahmin ve deneysel değerleri.

No	X_1	X_2	X_3	X_4	Kitosanaz aktivitesi (U mL ⁻¹)	
					Deneysel	Tahmini
1	5	5	5	2	5,7	7,26
2	10	8	5	2	17,3	18,5
3	7,5	9,5	7,5	3,5	18,5	16,66
4	10	8	10	5	14,5	14,7
5	10	5	5	2	15,7	15,16
6	7,5	3,5	7,5	3,5	10,4	9,99
7	7,5	6,5	7,5	3,5	17,7	18,51
8	5	5	10	5	4,9	5,48
9	10	5	10	5	8,5	7,48
10	5	8	5	5	4,4	5,41
11	10	5	10	2	8,2	8,96
12	10	8	10	2	14,8	15,85
13	7,5	6,5	7,5	3,5	18,9	18,51
14	5	8	10	5	7,8	8,81
15	10	8	5	5	15,8	15,26
16	7,5	6,5	7,5	3,5	18,3	18,51
17	5	8	10	2	7,5	8,0
18	7,5	6,5	7,5	3,5	17,15	18,51
19	10	5	5	5	10,3	11,58
20	7,5	6,5	2,5	3,5	11,4	10,08
21	12,5	6,5	7,5	3,5	15,5	15,43
22	7,5	6,5	7,5	0,5	13,2	10,81
23	7,5	6,5	7,5	6,5	7,9	8,04
24	5	5	5	5	6,2	5,63
25	5	5	10	2	4,0	5,01
26	7,5	6,5	7,5	3,5	18,9	18,51
27	7,5	6,5	12,5	3,5	8,2	7,28
28	2,5	6,5	7,5	3,5	3,8	1,62
29	7,5	6,5	7,5	3,5	20,1	18,51
30	5	8	5	2	5,2	6,70

X_1 - Çözünür nişasta (g L⁻¹), X_2 - Kolloidal kitosan (g L⁻¹), X_3 - Pepton (g L⁻¹), X_4 - NaCl (g L⁻¹).

Modele göre, çözünür nişasta ve kolloidal kitosan (X_1X_2), çözünür nişasta ve pepton (X_1X_3) ve kolloidal kitosan ile pepton (X_2X_3) arasında etkileşim iki değişken arasındaki önemli korelasyonu göstermektedir ve bunların kitosanaz üretimini arttırıcı etkilerini de göstermektedir (Çizelge 4.11).

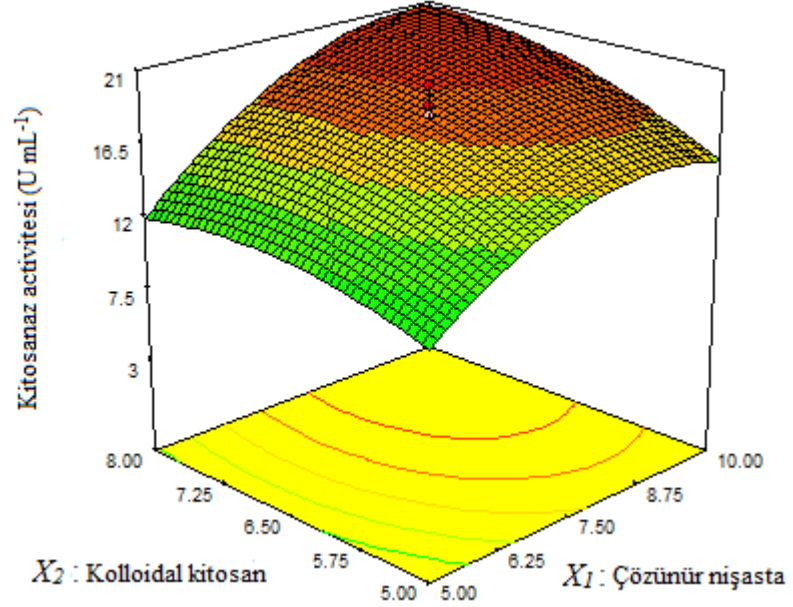
Çizelge 4.11. Merkezi Kompozit Tasarımın deney sonuçları için ANOVA.

Kaynak	SS	DF	MS	F-Değeri	p- değeri Prob > F	Anlamlılık
Model	806,48	14	57,60	23,29	< 0,0001	Anlamlı
X_1	285,66	1	285,66	115,51	< 0,0001	
X_2	66,67	1	66,67	26,96	0,0001	
X_3	11,76	1	11,76	4,76	0,0455	
X_4	11,48	1	11,48	4,64	0,0478	
X_1X_2	15,21	1	15,21	6,15	0,0255	
X_1X_3	15,60	1	15,60	6,31	0,0239	
X_1X_4	3,8	1	3,8	1,54	0,2340	
X_2X_3	12,60	1	12,60	5,10	0,0393	
X_1^2	170,86	1	170,86	69,09	< 0,0001	
X_2^2	46,06	1	46,06	18,62	0,0006	
X_3^2	165,76	1	165,76	67,03	< 0,0001	
X_4^2	141,44	1	141,44	57,19	< 0,0001	
Artan	37,10	15	2,47			
Uyum eksikliği F değeri (Lack of Fit)	31,71	10	3,17	2,95	0,1223	Anlamlı değil
Saf Hata	5,38	5	1,08			
Toplam	843,55	29				

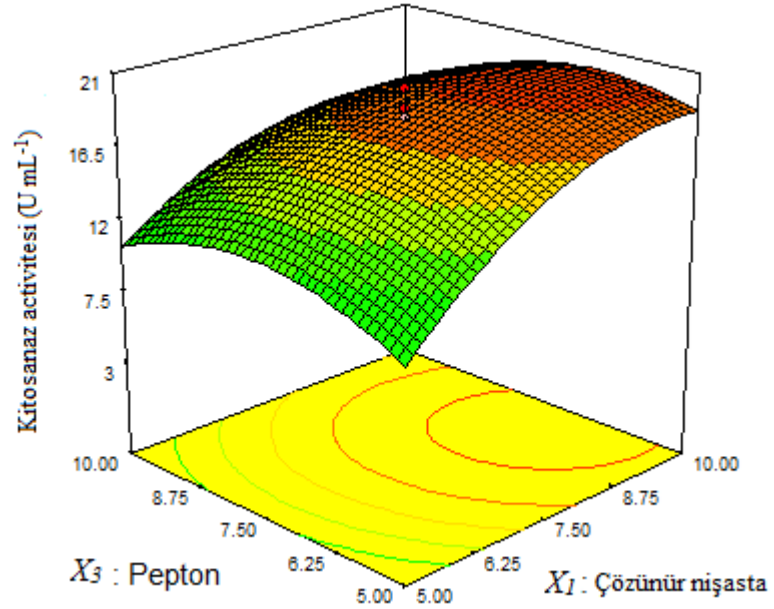
$R^2 = 0,9560$, düzeltilmiş $R^2 = 0,9150$, tahmin edilen $R^2 = 0,7743$, varyans katsayısı = %13,45, SS, kareler toplamı; DF, serbestlik derecesi; MS, kareler ortalaması.

Üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri, değişkenler ve bunların bireysel optimal seviyeleri arasındaki etkileşimi göstermektedir (Şekil 4.22-4.27). Enzim aktivitesi çözünür nişasta konsantrasyonundaki artışla birlikte artmıştır, ancak çözünür nişasta konsantrasyonunda 8g L^{-1} dan daha fazla artışın kitosanaz üretimi üzerinde herhangi bir etkisi yoktur. Kolloidal kitosan için, kitosanaz aktivitesi başlangıçta 7g L^{-1} konsantrasyonu'ya kadar artmıştır ama, konsantrasyonundaki daha fazla artış, kitosanaz aktivitesinde bir düşüşe neden olmuştur. Benzer şekilde, pepton ve NaCl için optimum konsantrasyonlar sırasıyla 7.8g L^{-1} ve 3.5g L^{-1} iken, daha

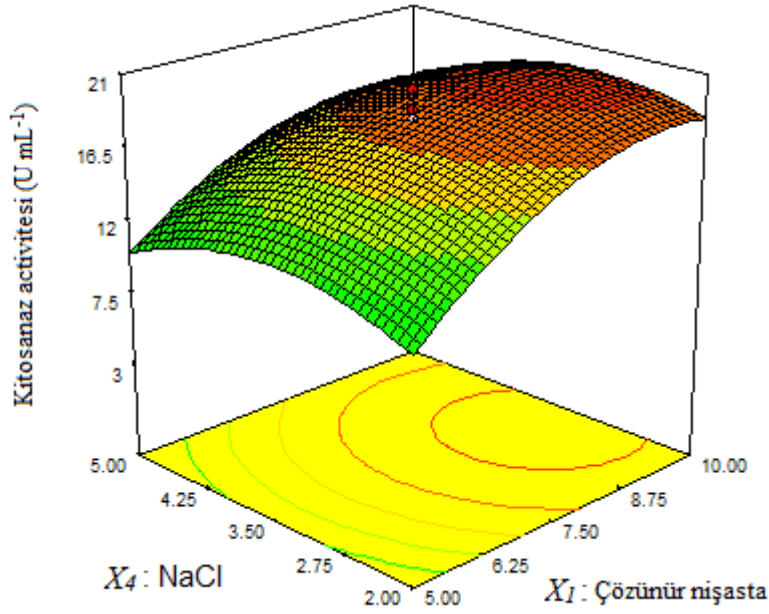
düşük ve daha yüksek konsantrasyonları, kitozanaz üretimi üzerinde negatif etkiyi neden olmuştur.



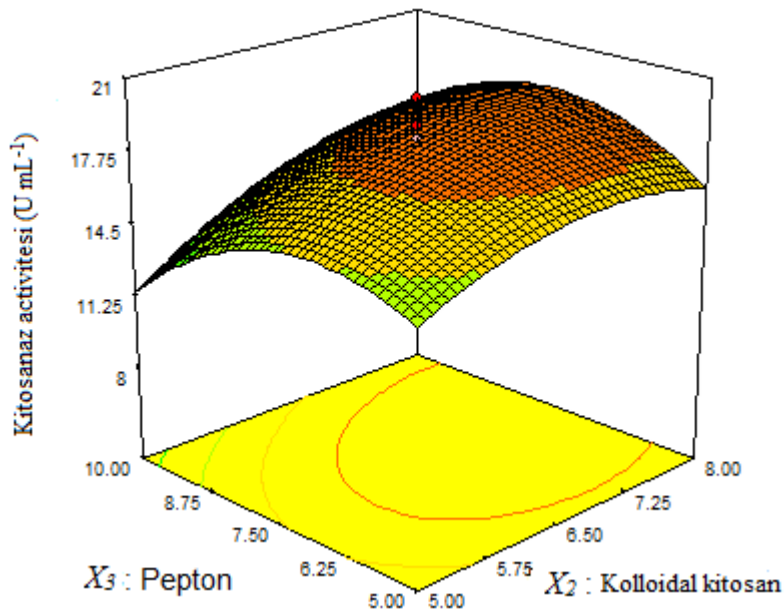
Şekil 4.22. Koloidal kitosan ve çözünür nişastanın kitozanaz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği. Pepton (X_3) ve NaCl (X_4) konsantrasyonları sırasıyla 7,5 ve 3,5 g L⁻¹ dir.



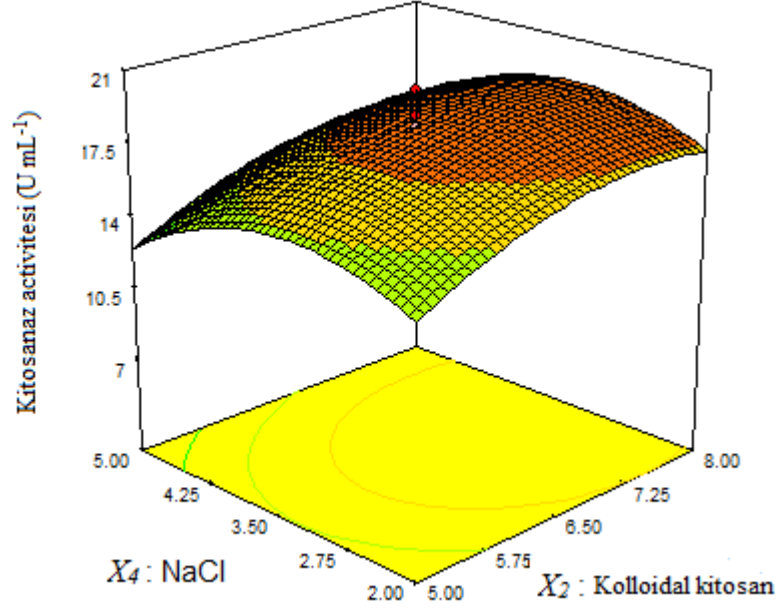
Şekil 4.23. Pepton ve çözünür nişastanın kitozanaz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği. Koloidal kitosan (X_2) ve NaCl (X_4) konsantrasyonları sırasıyla 6,5 ve 3,5 g L⁻¹ dir.



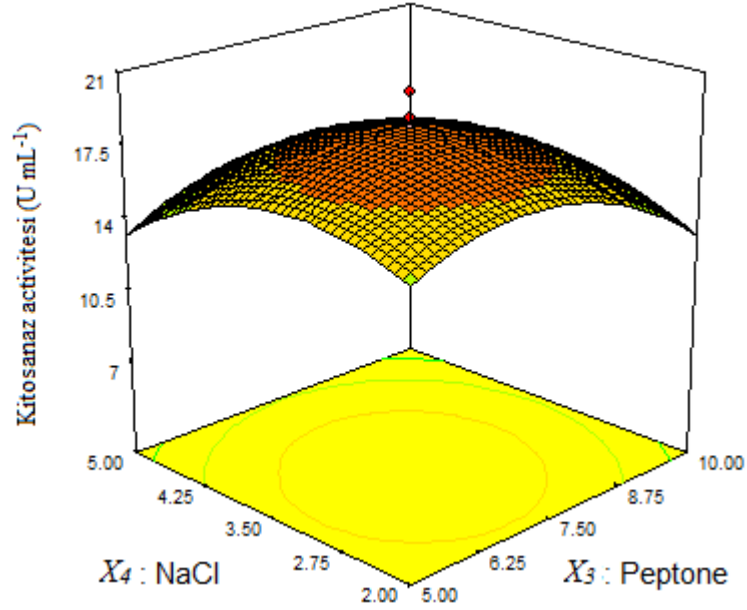
Şekil 4.24. NaCl ve çözünür nişastanın kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği. Kolloidal kitosan (X_2) ve pepton (X_3) konsantrasyonları sırasıyla 6,5 ve 7,5 g L⁻¹ dir.



Şekil 4.25. Pepton ve kolloidal kitosanın kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği. Çözünür nişasta (X_1) ve NaCl (X_4) konsantrasyonları sırasıyla 7,5 ve 3,5 g L⁻¹ dir.



Şekil 4.26. NaCl ve kolloidal kitosanın kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği. Çözünür nişasta (X_1) ve pepton (X_3) konsantrasyonları sırasıyla 7,5 ve 7,5 g L⁻¹ dir.



Şekil 4.27. NaCl ve peptonun kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiği. Çözünür nişasta (X_1) ve kolloidal kitosan (X_2) konsantrasyonları sırasıyla 7,5 ve 6,5 g L⁻¹ dir.

Bu sonuçlar ışığında, kolloidal kitosan, pepton ve NaCl'nin daha düşük ve daha yüksek seviyeleri, nispeten düşük kitosanaz aktivitesi gösterirken bu üç faktörün orta düzeylerinde maksimum aktivite elde edilmiştir. Elde edilen deneysel verilere dayanarak kitosanaz aktivitesi 3,8 ile 20,1 U mL⁻¹ arasında

değişmektedir ve maksimum kitosanaz üretimi ($20,1 \text{ U mL}^{-1}$) $7,5 \text{ g L}^{-1}$ çözünür nişasta, $6,5 \text{ g L}^{-1}$ koloidal kitosan, $7,5 \text{ g L}^{-1}$ pepton ve $3,5 \text{ g L}^{-1}$ NaCl içeren üretim ortamında (29 no.lu deneme) belirlenmiştir.

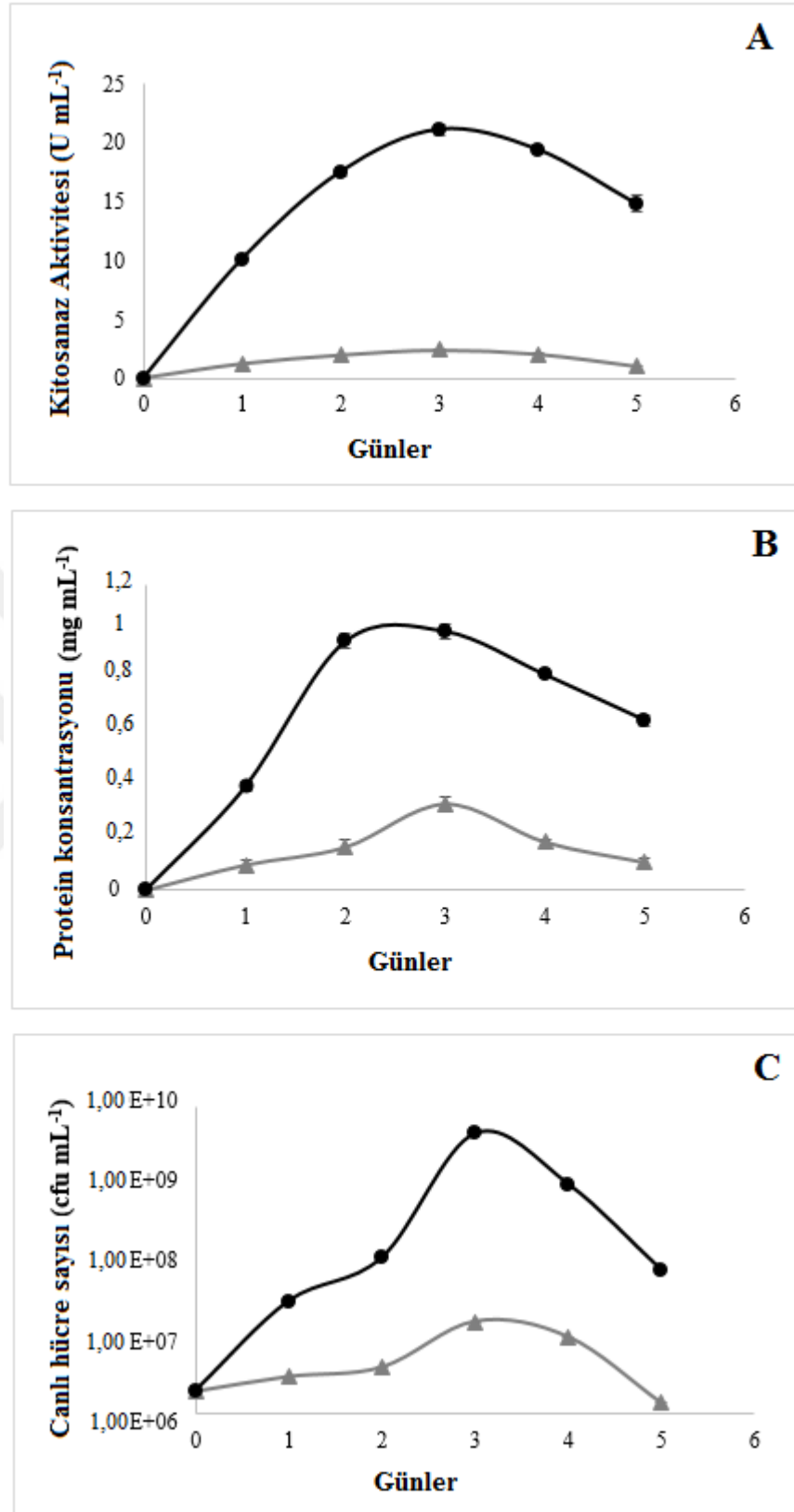
4.2.4 Optimizasyon modelinin doğrulanması

Sayısal optimizasyona göre, tahmin edilen maksimum kitosanaz aktivitesi ($20,43 \text{ U mL}^{-1}$) $7,8 \text{ g L}^{-1}$ çözünür nişasta, $7,0 \text{ g L}^{-1}$ koloidal kitosan, $6,5 \text{ g L}^{-1}$ pepton ve $2,7 \text{ g L}^{-1}$ NaCl ile elde edilebilir. Doğrulama deneyleri bu tahmin edilen değerleri kullanarak üç tekrarla gerçekleştirilmiştir ve modelin tahmin değeri ($20,43 \text{ U mL}^{-1}$) iken elde edilen kitosanaz aktivitesinin ortalama değeri $21,3 \text{ U mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Tahmin edilen ve deneysel değerler arasındaki nispeten düşük tutarsızlık bu çalışmada kullanılan RSM'in son derece uygun olduğunu ortaya koymuştur. Optimizasyondan önce $2,24 \text{ U mL}^{-1}$ kitosanaz aktivitesi optimizasyondan sonra 9,5 kat artarak $21,3 \text{ U mL}^{-1}$ 'e yükselmiştir. Birkaç çalışma şimdiki sonuçlara kıyasla daha fazla aktivite bildirmiştir ancak bizim değerimiz ($21,3 \text{ U mL}^{-1}$), *Bacillus* suşları ile kitosanaz üretiminin çalışıldığı yeni çalışmaların birçoğundan daha yüksektir (Çizelge 4.12). Bu karşılaştırma ile, incelediğimiz suşun literatürde bugüne kadar rapor edilen kitinolitik *Bacillus* suşları arasında etkili bir kitosanaz üreticisi olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.12. *Bacillus mojavensis*'in kitosanaz aktivitesinin literatürde bildirilen *Bacillus* suşlarıyla karşılaştırılması.

<i>Bacillus</i> suşları	Kitosanaz aktivitesi (U mL^{-1})	Referans
<i>Bacillus mojavensis</i> EGE-B-5.2i	21,3	Bu çalışma
<i>Bacillus cereus</i> CH12	11,16	(Prakash and Gopal, 2017)
<i>B. cereus</i> C-01	0,8	(de Araújo et al., 2016)
<i>Bacillus mycoides</i> TKU038	0,58	(Liang et al., 2016)
<i>Bacillus thuringiensis</i> ZJOU-010	4,25	(Chen et al., 2011)
<i>Bacillus cereus</i> TKU018	22	(Wang et al., 2009)

B. mojavensis'in kitosanaz üretimi hem optimize edilmiş hem de optimize edilmemiş ortamı kullanarak gerçekleştirilmiştir ve her ikisi için kitosanaz aktivitesi, protein konsantrasyonu ve oluşan biyokütle (canlı hücre sayısı) miktarı incelenmiştir. Şekil 4.28'de optimizasyondan önce ve optimizasyondan sonra, kitosanaz üretimi, protein konsantrasyonu ve biyokütle miktarı gösterilmiştir, ortalamalar ve standart sapma ($\pm$ SS) değerleri Çizelge 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.28. Optimize edilmemiş fermantasyon ortamda ($\blacktriangle$) ve optimize edilmiş ortamda ($\bullet$) kitosanaz aktivitesi (U mL^{-1}) (A), kültür süpernatantındaki protein konsantrasyonu (mg mL^{-1}) (B) ve biyokütle (canlı hücre sayısı) miktarı (cfu mL^{-1}) (C).

Çizelge 4.13. Optimize edilmemiş fermantasyon ortamda ve optimize edilmiş ortamda kitosanaz aktivitesi, kültür süpernatantındaki protein konsantrasyonu ve biyokütle miktarı.

Gün	Optimizasyondan önce			Optimizasyondan sonra		
	Kitosanaz aktivitesi (U mL ⁻¹)±SS	Protein konsantrasyonu (mg mL ⁻¹)±SS	Canlı hücre sayısı (cfu mL ⁻¹)±SS	Kitosanaz aktivitesi (U mL ⁻¹)±SS	Protein konsantrasyonu (mg mL ⁻¹)±SS	Canlı hücre sayısı (cfu mL ⁻¹)±SS
1	1,24±0,02	0,09±0,02	3,1±3,3×10 ⁶	10,1±0,1	0,41±0,042	3,1±4,9×10 ⁷
2	1,98±0,05	0,17±0,03	4,0±4,5×10 ⁶	17,5±0,4	0,98±0,03	1,1±4,9×10 ⁸
3	2,41±0,02	0,34±0,03	1,6±4,9×10 ⁷	21,1±0,52	1,02±0,03	4,6±9,0×10 ⁹
4	2,06±0,04	0,20±0,01	1,0±5,7×10 ⁷	19,4±0,01	0,85±0,025	9,9±8,2×10 ⁸
5	1,0±0,03	0,11±0,02	1,4±5,7×10 ⁶	14,8±0,73	0,67±0,04	7,4±13,9×10 ⁷

Şekillerde gösterildiği gibi enzim aktivitesi (3,24 96 U mL⁻¹), protein (0,22 mg mL⁻¹) ve biyokütle (1,6±2,2×10⁷ cfu mL⁻¹) değerleri optimize edilmemiş ortamda çok düşüktür ama, klasik ve istatistiksel optimizasyonlar sonrasında önemli bir artış sağlanmıştır ve bu da yapılan optimizasyonun başarısını doğrulamaktadır. Ayrıca, optimize ortam ile, üretim süresi çalışmalarında, kitosanaz aktivitesinin ilk günde düşük olduğunu ve 2 gün sonra (48 saatte) aktivitesinde belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. Maksimum kitosanaz aktivitesi, 3 gün sonrasında 21,1 U mL⁻¹'e ulaşmıştır (Şekil 4.28 A).

Ekstrasellüler protein miktarı da yavaş yavaş artmış ve birinci günde 0,41 mg mL⁻¹'den üçüncü günde 1,02 mg mL⁻¹'ye yükselmiştir (Şekil 4.28 B). Aynı şekilde, *B. mojavensis*'in kitosanaz aktivitesinin de üçüncü günde (72 saatte) en yüksek olduğu belirlenmiş ve sonra aşamalı bir düşüş izlenmiştir. 3 gün sonra gözlenen kitosanaz aktivitesindeki düşüş katabolit baskı veya besin öğelerinin azalmasından kaynaklanabilir. Daha önceki çalışmalarda, *Bacillus* suşların kitosanaz üretimi için optimum üretim süresi 72 saat (Prakash and Gopal, 2017), 50 saat (Wee et al., 2009), 96 saat (Sun et al., 2007) ve 32 saat (Lee et al., 1996) olarak belirlenmiştir. *Bacillus* suşlarıyla kitosanaz enzimi için üretim süresinin kullanılan suşa ve üretim ortamının içeriklerine göre değişiklik gösterdiği anlaşılmaktadır. Fermantasyon sırasında enzim üretiminin hücre büyümesiyle birlikte artması, kitosanaz üretiminin büyümeye bağlı bir süreç olduğunu ortaya koymaktadır. 3 gün sonunda biyokütle miktarı, maksimum kitosanaz aktivitesi ve protein miktarı ile birlikte maksimum bir değere (4,6±2,7×10⁹) ulaşmış ve daha sonra substratın tükenmesine bağlı olarak düşüş fazı gerçekleşmiştir (Şekil 4.28

C). İstatistiksel optimizasyonlar öncesi ve sonrasında, zamana bağlı olarak kitosanaz aktivitesi, protein miktarı ve biyokütle miktarını gösteren grafikler beklenen şekilde birbirine paralel çıkmıştır. *Bacillus* suşları daha önce kitosanaz üretimi için kullanılmış olmasına rağmen, istatistiksel tasarımlar kullanarak kitosanazın optimizasyonu az sayıdaki çalışmada denenmiştir. Optimizasyondan sonra kitosanaz aktivitesinde 9,5 katlık artış optimizasyonun başarısını göstermektedir.

4.3 Kitosanazın Saflaştırılması

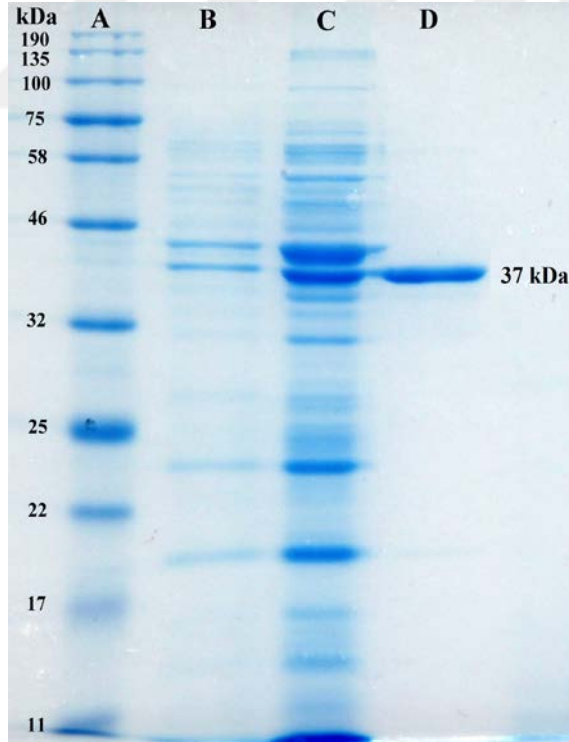
Enzim saflaştırma stratejileri genellikle ham enzim konsantrasyonunu, protein fraksiyonlamayı ve ardından kromatografik ayırma tekniklerini içermektedir. Bu çalışmada, *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kültür süpernatantından hücre dışı bir kitosanaz saflaştırılmıştır. Saflaştırma adımları Çizelge 4.14'de özetlenmiştir. Suş, daha önce tarif edilen koşullar (3.2.2.1 ve 4.2.3) altında optimize edilmiş ortamda kültüve edildikten sonra kültür süpernatantında bulunan kitosanaz, amonyum sülfat kullanılarak çökteltilmiştir. Maksimum kitosanaz aktivitesi %72,3'lük verim ve 13 U mg⁻¹'lik spesifik aktivitesi %80 amonyum sülfat çöktelmesi ile bulunmuştur. Kitosanaz için saflaştırma katmanı bu aşamada 1,9 bulunmuştur.

Çizelge 4.14. *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i'in kitosanazın saflaştırma adımlarının özeti.

Saflaştırma basamağı	Hacim (mL)	Protein (mg mL ⁻¹)	Toplam protein (mg)	Kitosanaz aktivitesi (U mL ⁻¹)	Toplam aktivitesi (U)	Spesifik aktivite (U mg ⁻¹)	Geri kazanım (%)	Saflaştırma katsayısı
Kültür süpernatantı	100	2,47	247	17,1	1710	6,9	100	1,0
Amonyum sülfat fraksiyonlaması	20	4,76	95,2	61,8	1236	13,0	72,3	1,9
Diyaliz	20	2,04	40,8	54,8	1096	26,9	64,1	3,9
İyon değiştirme kromatografisi	2	2,04	4,08	54,8	109,6	26,9		
Kromatografiden sonra toplanan fraksiyonlar	1	0,27	0,27	43,1	43,1	159,6	39,3*	5,9*

*, İyon değiştirme kromatografisinde toplam hacmin (20 mL) 2 mL'si kullanılmıştır, dolayısıyla bu basamak için geri kazanım ve saflaştırma katsayısı, sırasıyla, bu basamaktaki toplam aktivitenin, bir önceki basamaktaki toplam aktivite ile ve bu basamaktaki spesifik aktivitesinin bir önceki basamaktaki spesifik aktivitesine bölünmesiyle hesaplanmıştır.

Amonyum sülfat çöktirmesinden elde edilen protein fraksiyonları, 20 mM Tris tamponuna (pH 8,0) karşı diyalizlenmiştir. Diyaliz basamağı, kitosanazın spesifik aktivitesinde 3,9 kat saflaştırma ile 26,9 U mg⁻¹ proteine kadar bir artışa yol açmıştır. Sonraki aşamada, kitosanaz, HiTrap Capto DEAE anyon değıştiricisini kullanarak, 20 mM Tris tamponu içinde 1M NaCl'nin kademeli bir gradyanı kullanılarak iyon değışim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Kitosanaz, %10-15 gradyan arasında akıtılarak aktif fraksiyonlar toplanmış ve saflaştırılmış bir kitosanazın konsantre bir preparasyonunu elde etmek için liyofilize edilmiştir. Çizelge 4.14'de gösterildiğı gibi, saflaştırılmış kitosanaz, 159,6 U mg⁻¹'lik bir spesifik aktiviteye ve %39,3'lük geri kazanım verimi ile 5,9'luk saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır. Konsantre ve saflaştırılmış fraksiyonların SDS-PAGE analizi ile saflığı teyit edilmiş ve 37 kDa'lık bir MW ile tekli kitosanaz bandının varlığı gösterilmiştir (Şekil 4.29). Genel olarak, elde edilen veriler iyi sonuçlara işaret etmektedir, çünkü sadece bir saflaştırma aşaması kullanılmış ve kitosanaz aktivitesi olmayan tüm proteinler bu prosedür ile elimine edilebilmiştir.



Şekil 4.29. Saflaştırılmış kitosanazın SDS-PAGE analizi. Şeritler: A, moleküler belirteçler; B, kültür süpernatantı; C, amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz sonrasında elde edilen protein fraksiyonları; D, iyon değıştirme kromatografisinden elde edilen aktif fraksiyonlarda bulunan saflaştırılmış kitosanaz.

SDS-PAGE sonuçları, saflaştırılmış kitosanazın tek bir protein olduğunu ve *B. mojavensis* EGE-B-5.2i'nin hücre dışı kültür süpernatantında yalnızca bir kitosanaz bulunduğunu ortaya koymuştur. Çizelge 4.15'te gösterildiği gibi, çalışmaların çoğu, tek bir mikrobiyal suştan sadece bir kitosanaz enziminin varlığını rapor etmişlerdir, ancak tek bir mikrobiyal suştan kaynaklanan birden fazla kitosanaz da az sayıda rapor edilmiştir. Lin et al. (2009), *B. cereus* NTU-FC-4'ün kültür süpernatantından üç farklı kitosanaz enzimini ve de Araújo et al. (2016), *B. cereus* C-01'den iki farklı kitosanaz enzimini saflaştırdıklarını belirtmişlerdir. Daha önce, kitosanazlar sıklıkla *Bacillus* suşlarından saflaştırılmıştır. Farklı *Bacillus* suşlarından elde edilen kitosanazların saflaştırma yöntemleri, molekül ağırlığı (kDa), saflaştırma katsayısı ve geri kazanımı (%) karşılaştırması Çizelge 4.15'te özetlenmiştir. Bu çalışmalara göre, *Bacillus* kitosanazlar'ın boyutunun tipik olarak 30-50 kDa arasında değiştiği belirtilmektedir. Bu çalışmada saflaştırılan kitosanazın boyutu, bildirilen aralıkta bulunmuştur. Düşük kitosanaz aktivitesi ve düşük spesifik aktiviteye sahip bazı fraksiyonlar toplanmış fraksiyonlara dahil edilmemiş ve amonyum sülfat çökmesi ve diyaliz adımları sırasında aktivite kaybının bir kısmı meydana gelmiş olsa da kitosanaz verimi (%39,3) bildirilen sonuçların çoğundan yüksektir.

Çizelge 4.15. Çeşitli *Bacillus* suşlarıyla yapılmış kitosanaz saflaştırma çalışmalarının karşılaştırılması.

<i>Bacillus</i> suşları	Saflaştırma metodu	kDa	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)	Referans
<i>B. cereus</i> S1	GF ve IEC	45	-	17,2	(Kurakake et al., 2000)
<i>B. subtilis</i> IMR-NK1	GF ve IEC	41	6,5	17	(Prakash and Gopal, 2017)
<i>Bacillus</i> sp. P16	IEC ve GF	45	11,7	45,3	(Jo et al., 2003)
<i>Bacillus</i> sp. KCTC 0377BP	GF ve IEC	45	24	46	(Choi et al., 2004)
<i>Bacillus</i> sp. S65	IEC ve GF	45	11,63	57,2	(Su et al., 2006)
<i>B. subtilis</i> TKU007	IEC ve GF	25	17,2	48	(Wang et al., 2008)
<i>B. cereus</i> D-11	GF ve IEC	41	8,8	3,9	(Gao et al., 2008)
<i>B. cereus</i> NTU-FC-4	IEC	41, 54 ve 46	22,1, 9,22 ve 281,78	1,07, 0,58, 2,14	(Lin et al., 2009)
<i>B. subtilis</i> CH2	GF	29	-	-	(Oh et al., 2011)
<i>B. cereus</i> TKU030	GF ve IEC	43	88,5	23,6	(Chen et al., 2011)
<i>B. cereus</i> TKU034 ve <i>B. cereus</i> TKU033	IEC (DEAE) ve IEC (Macro-Prep DEAE)	43	441, 10,4	50,9, 2	(Liang et al., 2015)
<i>B. cereus</i> C-01	EBC	33 ve 44	1,26	31	(de Araújo et al., 2016)
<i>B. mojavensis</i> EGE-B-5.2i	IEC	37	5,9	39,3	Bu çalışma

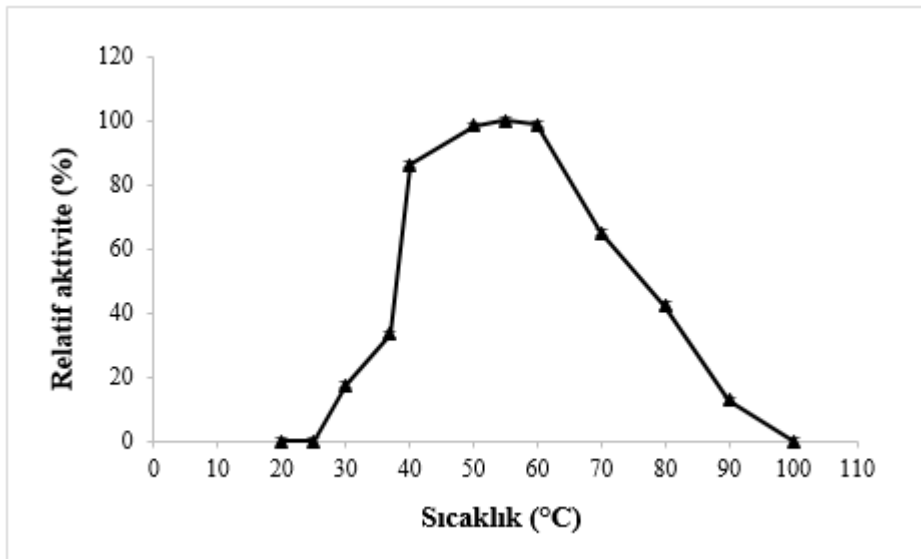
GF- Jel filtrasyonu, IEC- İyon Değişimi Kromatografisi, EBC- Genişletilmiş yataklı kromatografi.

4.4 Kitosanaz Enziminin Kısmi Karakterizasyonu

Saflaştırılmış kitosanaz enzimi optimum pH ve optimum sıcaklık, pH ve termal stabilitesi ve substrat özgüllüğü gibi bazı önemli özelliklerini incelemek için kullanılmıştır. Ayrıca metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisi ve kitosanazın kinetik parametreleri de belirlenmiştir.

4.4.1 Enzimin Optimum sıcaklığının ve termal stabilitesinin belirlenmesi

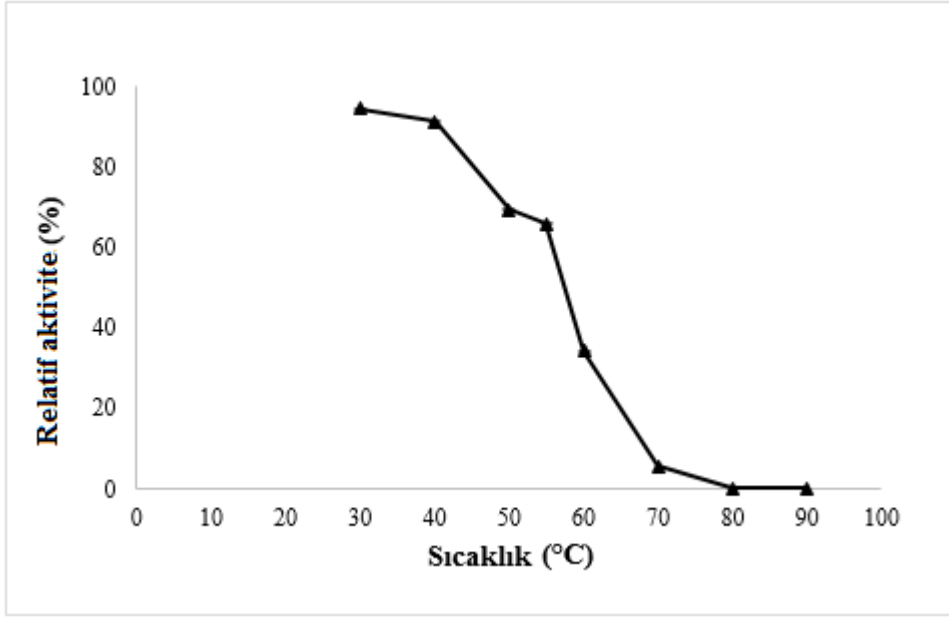
Saf kitosanazın aktivitesi üzerindeki çeşitli sıcaklıkların etkileri substrat olarak çözünen kitosan kullanılarak incelenmiştir. Yapılan denemelerin sonuçlarına göre en yüksek kitosanaz aktivitesinin ölçüldüğü optimum sıcaklık 55°C olarak belirlenmiştir. Daha sonra 55°C'deki kitosanaz aktivitesi %100 olarak kabul edilerek diğer sıcaklıklar için relatif enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Tüm ölçümler üçer kez alınmış, ortalamalar ve standart sapma ($\pm$ SS) hesaplanmıştır. ANOVA testi farklı sıcaklıklar ile kitosanaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğunu ($p \leq 0,05$) ve Tukey's testi 20°C - 30°C ve 50°C - 60°C'nin dışında kalan diğer tüm sıcaklıklarında kitosanaz aktiviteleri arasında önemli bir fark olduğunu ($p \leq 0,05$) göstermiştir. Farklı sıcaklıkların saflaştırılmış kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.30'da gösterilmiştir.



Şekil 4.30. Farklı sıcaklıkların *B. mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz aktivitesi üzerindeki pH 5,5'te belirlenen etkileri.

30°C'nin altında ve 100°C'de hiçbir kitosanaz aktivitesi bulunmamıştır ve 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C'de sırasıyla, %17, %34, %86, %98, %99, %63, %42 ve %12 relatif kitosanaz aktivitesi belirlenmiştir. 50 ve 60°C'deki enzim aktiviteleri (%98 ve %99), 55°C'deki optimum enzim aktivitesine çok yakın olduğundan, bu kitosanaz için uygun sıcaklık olarak 50-60°C'lik sıcaklık aralığı tavsiye edilebilir. Kitozanaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği optimum sıcaklıklar literatürde 37-60°C aralığında rapor edilmiştir (Çizelge 4.17).

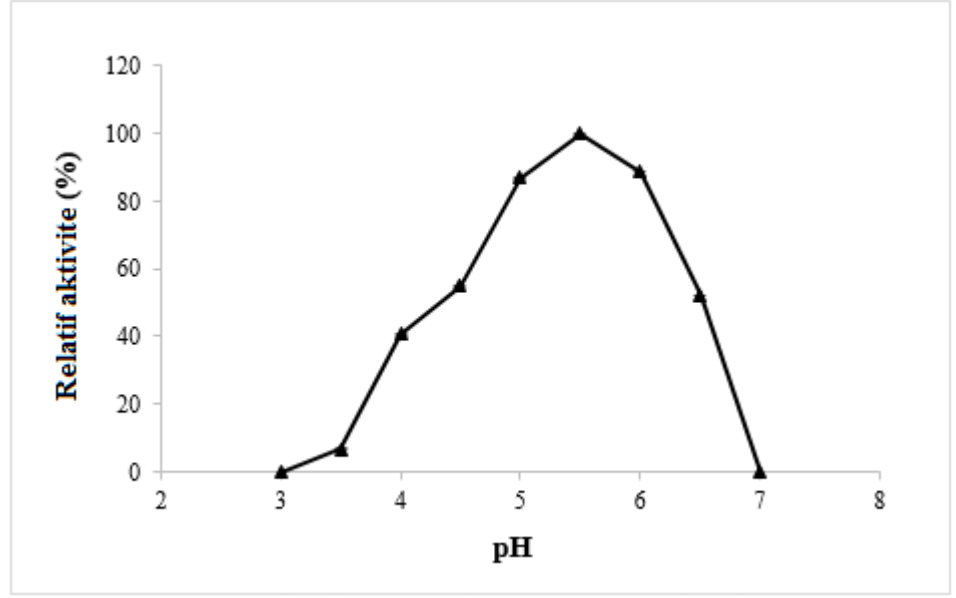
Enzim termostabilitesi çalışmalarında, deterjan üretimi, gıda ve nişasta işlenmesi, yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi ve PCR uygulamaları gibi çeşitli endüstriyel uygulamalar için yararlı olabilmeleri nedeniyle ekstreozimler üzerine yapılan çalışmalar giderek artmaktadır (Vieille and Zeikus, 1996; Lee and Vasmatzis, 1997; de Araújo, 2016). Enzim stabilitesinin enzimin raf ömrüne etki etmesi ve depolama sırasında karşılaşılan büyük mali giderler, araştırmacıları olumsuz koşullarda bile aktivitelerini koruyabilen stabil enzimleri bulmaya yöneltmiştir. Bu yüzden çalışmamızda mezofilik *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz enziminin sıcaklık stabilitesi incelenmiştir. Bunun için, 30-90°C arasındaki çeşitli sıcaklıklarda enzimin stabilitesi belirlenmiştir. Kitosanazın termal stabilitesi, enzimi farklı sıcaklıklarda substrat olmaksızın 20 mM asetat tamponu (pH 5,5) içinde 1 saat inkübe ederek incelenmiştir. İnkübasyonun sonunda kalan kitosanaz aktivitesi ölçülmüş ve başlangıç aktivitesini %100 alarak relatif aktiviteleri hesaplanmıştır. Enzim 80°C'de ve 90°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra tamamen inaktive olurken 30, 40, 50, 55, 60 ve 70°C'de sırasıyla %94, %91, %69, %66, %34 ve %6 relatif aktivite göstermiştir. Tüm aktivite ölçümleri üçer kez alınmış, ortalamalar ve standart sapma ($\pm$ SS) hesaplanmıştır. ANOVA testi farklı sıcaklıklardaki kitosanaz termostabiliteler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğunu ($p \leq 0,05$) ve Tukey's testi 30°C - 40°C, 50°C - 55°C ve 80°C - 90°C'nin dışında başka tüm sıcaklıklarında kitosanaz termostabiliteler arasında önemli bir fark olduğunu ($p \leq 0,05$) göstermiştir. Şekil 4.31'de *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz enziminin termal stabilitesine ait grafik verilmiştir. Sonuçlarımızı literatürle karşılaştırmak için, daha önce bildirilen çeşitli *Bacillus* suşlarının kitosanaz aktiviteleri ile birlikte termal stabiliteleri Çizelge 4.17'te gösterilmiştir.



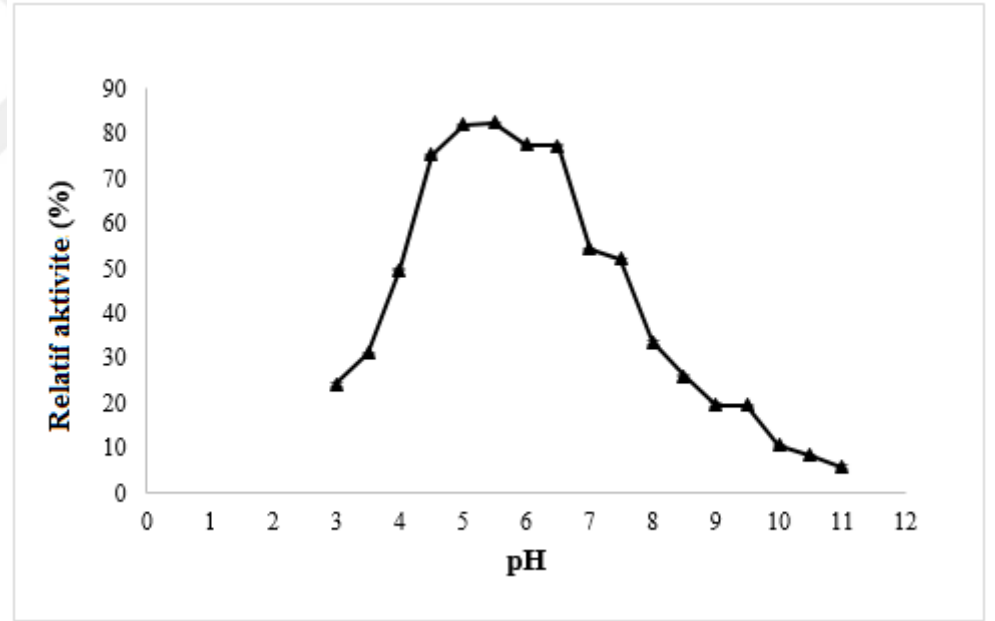
Şekil 4.31. Farklı sıcaklıklarda, 20 mM asetat tamponu (pH 5,5) içinde 1 saat inkübe ederek incelenmiş *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz enziminin termal stabilitesi.

4.4.2 Enzimin optimum pH ve pH stabilitesi

Enzimin optimum pH'sı, 20 mM asetat tamponu (pH 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 6,0 ve 6,5), 20 mM fosfat tamponu (pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0) ve 20 mM sodyum bikarbonat tamponu (pH 9,5, 10,0, 10,5 ve 11,0) kullanılarak 55°C'de tespit edilmiştir. Tüm ölçümler üçer kez alınmış, ortalamalar ve standart sapma ($\pm$ SS) hesaplanmıştır. ANOVA testi farklı pH değerlerindeki kitosanaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğunu ($p \leq 0,05$) ve Tukey's testi pH 3,5 - 6,5'in dışında kalan diğer tüm pH değerlerindeki kitosanaz aktiviteleri arasında önemli bir fark olduğunu ($p \leq 0,05$) göstermiştir. Farklı pH değerlerinin saflaştırılmış kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.32'de gösterilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi, kitosanaz pH 5,5'te maksimum aktivite göstermiştir. Kitosan substratları bazik pH'da çözünmediğinden pH 7,0 ve üstünde kitosanaz aktivitesini belirlemek mümkün olmamıştır (Liaqat and Eltem, 2018). Kitosanazın optimum pH'sı, literatürde karakterize edilen kitosanazlara benzerdi ve bu kitosanazların çoğunun optimum pH değeri 4,0-6,0 arasında değiştiği bildirilmiştir (Çizelge 4.17).



Şekil 4.32. Farklı pH değerlerinin 55°C'de tespit edilen *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkileri.



Şekil 4.33. Farklı pH değerlerinde 55°C'de *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz enziminin stabilitesi.

Enzimin pH stabilitesi, enzimi farklı pH tamponlarda 25°C'de, substrat olmaksızın 3 saat inkübe edilerek kalan kitosanaz aktivitesinin ölçülmesi ile belirlenmiştir. *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz enzimi 3,0-11,0 arasında geniş bir pH aralığında stabilite göstermiştir, ancak sodyum asetat tamponunda pH 3,5-6,5 aralığında daha aktif ve stabil olduğu saptanmıştır. Enzim

pH 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 , 8,0, 8,5 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 ve 11,0 de sırasıyla %24, %31, %49, %75, %82, %82, %78, %77, %54, %52, %33, %26, %20, %19, %11, %8 ve %6 relatif aktivite göstermiştir (Şekil 4.33). Bu sonuçlar, enzimin geniş bir pH stabilite aralığına sahip olduğunu ve sadece aşırı pH değerlerinin enzimatik aktiviteyi zamanla azalttığını ortaya koymuştur.

4.4.3 Enzimin substrat özgüllüğü

Saflaştırılmış kitosanazın aktivitesi, %1'lik konsantrasyonda çeşitli substratlar kullanılarak belirlenmiştir. *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz enzimi, süspanse kitin, kolloidal kitin ve süspanse kitosanı hidrolize edememiştir. Düşük moleküler ağırlıklı kitosana karşı enzim aktivitesi, yüksek moleküler ağırlıklı kitosanın enzim aktivitesinden daha yüksektir. En iyi enzim aktivitesi çözünür kitosan ile gözlemlendiğinden, çözünür kitosan bu enzim için en iyi substrat olarak tespit edilmiştir. Çözünür kitosan ile enzim aktivitesi %100 olarak tanımlanmış ve farklı substratların relatif enzim aktiviteleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.16). Çizelge 4.17'te özetlendiği gibi mevcut sonuçlar, önceki literatür bulgularıyla uyumludur ve çalışmaların çoğunda, kitosanaz aktivitesi için en uygun substrat olarak çözünür kitosan bildirilmiştir.

Çizelge 4.16. *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz enziminin substrat özgüllüğü.

Substratları		Relatif aktivitesi (%)
Kitosan, düşük moleküler ağırlıklı 75-85% deasetile (Sigma 448869)	Çözünür	100±0,23
	Kolloidal	83,4±0,75
	Süspanse	0
Kitosan, karides kabuklarından, ≥75% deasetile (Sigma C3646)	Çözünür	68,3±0,05
	Kolloidal	64,9±0,41
	Süspanse	0
Kitin (Sigma C7170)	Kolloidal	0
	Süspanse	0
α-Selüloz (Sigma 6429)	Çözünür	7,2±0,15
Çözünür nişasta (Sigma 9765)	Çözünür	4,7±0,05

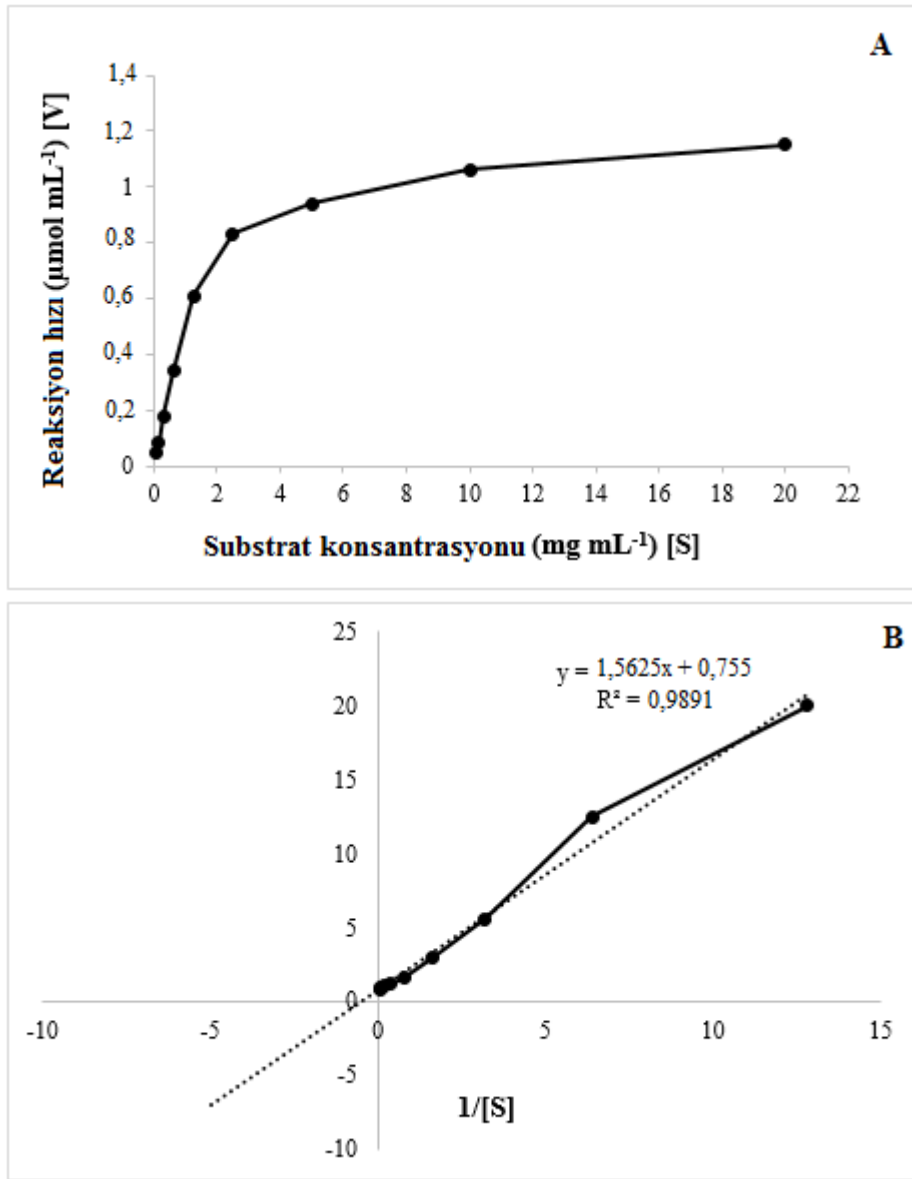
Çizelge 4.17. *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i suşunun kitosanaz enzimi karakteristiklerinin literatürde yer alan *Bacillus* kitosanazları ile karşılaştırılması.

<i>Bacillus</i> suşları	Optimum Sıcaklık	Optimum pH	Sıcaklık stabilitesi (1 saat)	pH stabilitesi (3 saat)	Enzim kinetiği		Optimal substrat	Referans
					K_m (mg mL ⁻¹)	V_{max}		
<i>B. cereus</i> S1	60°C	6	60°C'nin altında	6-11	-	-	Çözünür kitosan	(Kurakake et al., 2000)
<i>Bacillus</i> sp. CK4	55°C	7,5	80°C'de %66 aktivitesi	-	0,8	173 U mg ⁻¹	Çözünür kitosan	(Yoon et al., 2000)
<i>B. subtilis</i> IMR-NK1	45°C	4	40°C	5-9	-	-	Yengeç kitosanı	(Prakash and Gopal, 2017)
<i>Bacillus</i> sp. P16	60°C	5,5	50°C	4,5-10	0,52	7,71x10 ⁻⁶ mol/san/mg	Çözünür kitosan	(Jo et al., 2003)
<i>Bacillus</i> sp. KCTC 0377BP	60°C	4-8	45°C	4,8	1,1	-	Çözünür kitosan	(Choi et al., 2004)
<i>Bacillus</i> sp. S65	65°C	6	40°C'nin altında	5,5-6,5	-	-	%85 DA kitosan	(Su et al., 2006a)
<i>B. subtilis</i> TKU007	37°C	7	37°C'de %60	4-7	-	-	-	(Wang et al., 2008a)
<i>B. cereus</i> D-11	60°C	6	60°C'de %70	5-10	7,5	2,15x10 ⁻⁷ mol/mg/san	Çözünür kitosan	(Gao et al., 2008)
<i>B. cereus</i> TKU030	40°C	4	50°C'de %50	3-7	-	-	%60 DA kitosan	(Chen et al., 2011)
<i>B. cereus</i> TKU034	50°C	5	65°C'de %10	4-7,5	-	-	Çözünür kitosan	(Liang et al., 2015)
<i>B. cereus</i> C-01	50°C, 55°C	5,5, 6,5	55°C'de %91	5,5-8,5, 5,5-7,5	-	-	-	(de Araújo et al., 2016)
<i>B. mojavensis</i> EGE-B-5.2i	55°C	5,5	55°C'de %66 ve 60°C'de %34	3,0-11	2,1	244,5 µmol dk ⁻¹ mg ⁻¹	Çözünür kitosan	Bu çalışma

-, Tayin edilemedi, DA, asetilasyon derecesi.

4.4.4 Kinetik çalışmalar

Enzimin Michaelis-Menten kinetik parametreleri (K_m ve V_{max}) Lineweaver-Burk yöntemi ile farklı konsantrasyonda (0,16, 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5,0, 10 ve 20 mg mL^{-1}) çözünür kitosan kullanılarak belirlenmiştir. Michaelis-Menten denklemi K_m ve V_{max} 'ı hesaplamak için kullanılabilir, ancak genellikle yüksek substrat konsantrasyonlarında başlangıç tepkime hızlarının ölçülmesindeki bu denklem hata verebilir. Bu nedenle, kinetik parametreleri hesaplamak için Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır.



Şekil 4.34. Kitosanz için, Michaelis-Menten grafiği (A) ve Lineweaver-Burk grafiği (B). Enzim aktivitesi 55°C ve pH 5.5'te belirlenmiştir.

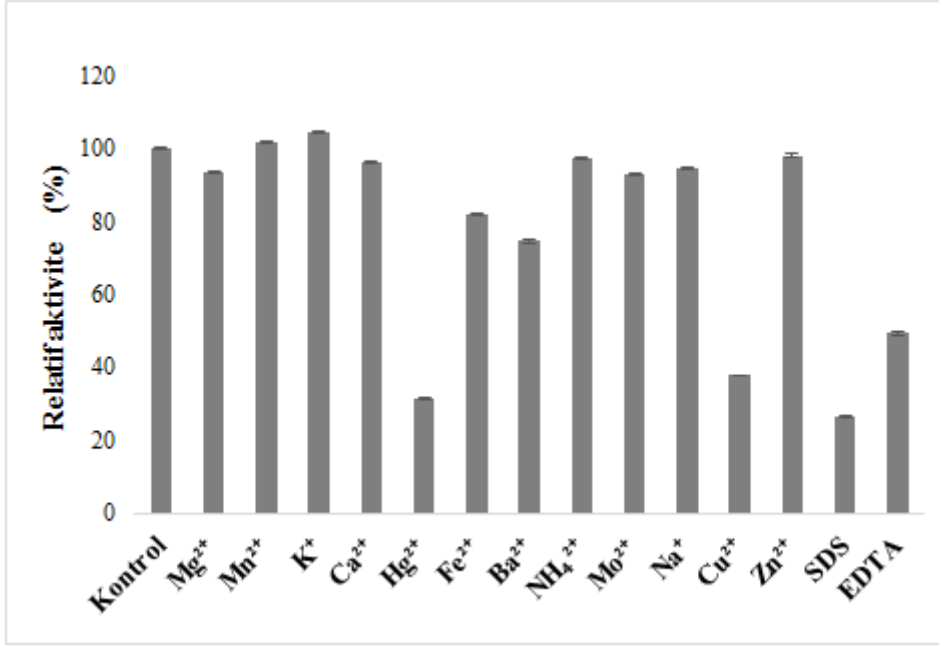
Lineweaver-Burk grafiği, deneysel verilerin normalleştirilmesini sağlayan Michaelis-Menten denkleminin doğrusallaştırılmasıdır. Lineweaver-Burk grafiği, enzim üzerinde substrat konsantrasyonu inhibisyonu olmadığını gösteren yüksek substrat konsantrasyonlarında eğriden sapma göstermemektedir. Daha fazla devinim ile K_m ve V_{max} 'ın daha doğru tahminini verir ve hata da kantitatif olarak tahmin edilebilir (Pant et al., 2008). Kinetik analiz, kitosanazın K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla $2,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ve $244,5 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ olduğunu ortaya koymuştur. Daha küçük K_m değeri, enzimin substrata yüksek afinitesi olduğunu göstermektedir. Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.34'te ve sonuçlarımızın literatürle karşılaştırılması Çizelge 4.17'te verilmiştir.

4.4.5 Enzim aktivitesine metal iyonlarının ve kimyasalların etkileri

PH, sıcaklık ve iyonik kuvvete ek olarak, enzim reaksiyonları, metal iyonlarının, hidrofobik maddelerin veya deterjanların protein yüzeyi ile etkileşimleri gibi doğrudan reaksiyona dahil olmayan bileşiklerden de etkilenebilmektedir. Tamponun bileşenleri, enzim yapısı üzerinde stabilize edici veya destabilize edici etkiye sahip olabilir. İyonlar enzim aktivitesini hem doğaları hem de iyonik güçleri ile etkilemektedir. Bazı durumlarda, tamponun bileşenleri, tek veya çift değerli metal iyonları gibi, temel kofaktörler olarak gerekliyse iç faktörleri yer değiştirerek, doğrudan katalitik süreci etkilemektedir. Metal iyonları genellikle katalitik süreci kolaylaştırır ve bazen enzim aktivitesinde bir kayba neden olabilir (Bisswanger, 2014). Metal iyonları, birçok enzimin biyolojik işlevinde önemli roller oynamaktadır. Metaller elektron vericiler, alıcılar veya yapısal düzenleyiciler olarak hizmet edebilmektedir (Riordan, 1977). Kitosanaz aktivitesi, Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} ve Ag^+ gibi farklı metal iyonları tarafından etkilenmektedir. Cu^{2+} ve Mn^{2+} , farklı kitosanazlar için bir aktivatör veya bir inhibitör gibi etki göstermektedir. Hg^{2+} ile kitosanaz inhibisyonu, kitosanaz grubunun genel bir özelliğidir (Thadathil and Velappan, 2014).

Metal iyonlarının ve bazı kimyasalların kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkileri enzimi kimyasal bileşiklerle 20 mM asetat tamponu içinde 25°C 'de 30 dakika inkübe edilerek incelenmiştir ve sonuçlar Şekil 4.35'te gösterilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi herhangi bir metal ilavesi içermeyen enzim aktivitesi (kontrol) relatif

aktiviteleri hesaplamak için %100 olarak kabul edilmiştir. Tüm ölçümler üçer kez alınmış, ortalamalar ve standart sapma ($\pm$ SS) hesaplanmıştır.



Şekil 4.35. Farklı metal iyonlarının ve bazı kimyasalların 5 mM konsantrasyonda kitosanaz aktivitesi üzerindeki etkileri.

Mn²⁺ ve K⁺, sırasıyla %101 ve %105'lik yüksek relatif aktiviteler ile enzim aktivitesini oldukça az bir oranda aktive etmiştir. Hg²⁺, Cu²⁺, SDS ve EDTA sırasıyla, %31, %38, %26 ve %49 oranında relatif aktiviteleri göstererek enzim aktivitesine belirgin olarak inhibe etmiştir. Aynı zamanda, Fe²⁺ ve Ba²⁺ sırasıyla %82 ve %75 relatif aktivitelerini göstererek enzim aktivitesini inhibe edilmiştir. Ancak diğer metaller enzim aktivitesine üzerine çok az bir inhibisyon etkisi yapmıştır.

Daha önce yapılan bir çalışmada, Mn²⁺'nin kitosanaz aktivitesini belirgin şekilde iyileştirebileceği ama Fe³⁺, Cu²⁺ ve Zn²⁺'nin aktivitesini önemli ölçüde inhibe edebileceği bildirilmiş ve çalışmamıza benzer sonuçlar elde edilmiştir. (Su et al., 2006a). Gao et al. (2008), da Hg²⁺'nin kitosanazı tamamen inaktive ettiği ve Cu²⁺'nin da önemli ölçüde inhibe edici etki gösterdiği bildirmiştir. Wang et al. (2008), *Bacillus* TKU007'nin Cu²⁺ tarafından kitosanaz aktivitesinin tam inhibisyonunu bildirmiştir. Başka bir çalışmanın sonuçları, kitosanazın K⁺ ile hafifçe aktive edildiği, Hg²⁺ tarafından tamamen inaktive edildiği ve Cu²⁺ tarafından önemli ölçüde inaktive edildiği bildirmiştir (Jo et al., 2003), ve bu sonuçlar çalışmamızdaki mevcut

bulgularla uyumludur. Chiang et al. (2003), kitosanazın Hg^{2+} tarafından önemli derecede inhibe edildiğini, ancak diğer metal iyonlarından çok fazla etkilenmediğini bulmuştur. Merkür iyon bir merkaptit oluşturuucu maddedir ve Hg^{2+} ile kitosanazın inhibisyonu, enzimin aktif bölgesinde bir sülfidril grubuna sahip olduğunu ortaya koymuştur. Baska bir çalışmada, Hg^{2+} 'nin varlığında, kitosanaz aktivitesinde %68'lik bir azalma olduğu belirlenmiş ve Hg^{2+} 'nin kitosanaz inhibisyonunun, kitosanaz grubunun genel bir özelliği olduğu belirtilmiştir (Choi et al., 2004).

Ayrıca, mevcut literatür bulgusu ile tutarsız olarak Mn^{2+} varlığında, kitosanaz aktivitesinde kitosanaz inhibisyonu (Liang et al., 2014a) ve yine Mn^{2+} 'nin kitosanaz inhibisyonunun kendine özgü bir özellik olduğu belirtilerek kitosanaz aktivitesinde %69 oranında azalma olduğu (Choi et al., 2004) da rapor edilmiştir. Çalışmamızda mevcut literatür bulgusuna uygun olarak Mn^{2+} 'nin kitosanaz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gözlenmediği gibi çok az da olsa bir aktivasyon etkisi gözlenmiştir. Aktivasyonda 1,62 kat artış ile Mn^{2+} ile kitosanazın güçlü bir şekilde aktivasyonunu bildiren yakın tarihli bir çalışma bulgularımızı desteklemektedir. Bu çalışma, Ba^{2+} ve Mg^{2+} 'nin pozitif etkisini ve Cu^{2+} , Fe^{2+} ve Zn^{2+} 'nin inhibe edici etkisini de bildirmiştir (de Araújo et al., 2016). Liang et al. (2015), Fe^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ve Mn^{2+} 'nin sırasıyla %56, %74, %100, %70 ve %78 oranında kitosanaz aktivitesi inhibisyonu gösterdiğini bildirilmiştir. EDTA ve SDS de enzim aktivitesini belirgin bir şekilde düşürmüş ve enzim molekülündeki kitosanolitik aktivite ile ilişkili olan disülfid bağı nedeniyle bu sonucun ortaya çıktığını öne sürmüştür (Liang et al., 2015).

4.5 Kitosan'dan Enzimatik Olarak Kitooligosakkaritlerin Üretimi

Zayıf asidik solüsyonlarda çözünürlüğü nedeniyle, kitosan içerisindeki β -1,4-glikosidik bağı ayrılması kitine kıyasla daha kolay ve daha verimli bir şekilde olabilmektedir. Dolayısıyla, kitosan daha hızlı hidrolize edilmekte ve sulu ortamda çözünmeyen ve heterojen olmayan kitinden daha yüksek bir verim vermektedir. Kitosanın oligosakkaritlere dönüştürülmesinde en önemli araç kitosanolitik enzimlerdir ve bu enzimlerin endo-kitosanaz aktivitesi kitooligosakkaritlerin üretiminden sorumludur. Bu nedenle, endo-kitosanazların reaksiyon desenine ilişkin büyük bir ilgi ortaya çıkmıştır (Jung and Park, 2014). Bu çalışmada, çeşitli kitinolitik

Bacillus suşlarının ham kitosanaz enzim çözeltileri, kitosanı kitooligosakkaritlere hidrolize etmek için kullanılmıştır.

4.5.1 Kitooligosakkaritlerin kantitatif analizi için HPLC yönteminin optimizasyonu

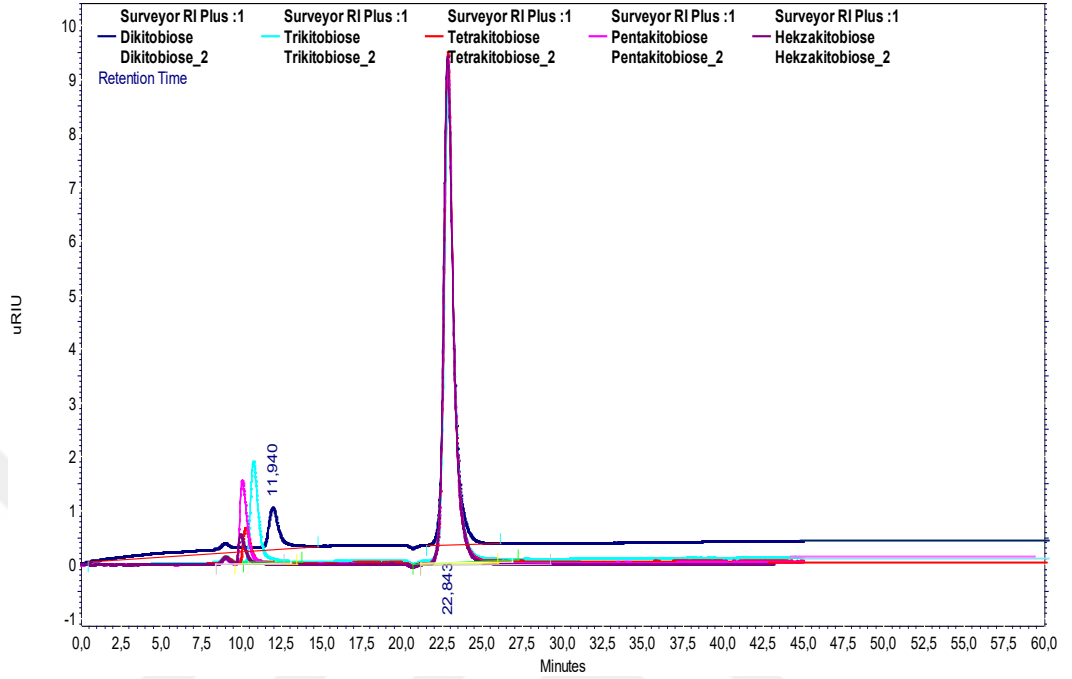
Çeşitli dedektörlerle birlikte kullanılabilen HPLC, kitooligosakkaritlerin analizi ve ayrılması için sıkça kullanılmıştır (Cao et al., 2016). Bu çalışmada, kitosanın enzimatik hidroliziyle elde edilen kitooligosakkarit karışımının analizi için HPLC kullanılmıştır. Öncelikle, kitooligosakkaritlerin ayrılması için en uygun yöntemi seçmek için kitooligosakkaritlerin ticari standartları (kitobiyoz, kitotrioz, kitotetroz, kitopentoz ve kitoheksoz), literatürde belirtilmiş olan farklı kolonlar, dedektörler ve çözücüler kullanarak HPLC ile analiz edilerek yöntem optimizasyonu yapılması için çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

4.5.1.1 HyperRez XP Carbohydrate H+ kolonu ile yapılan HPLC yöntem optimizasyon çalışmaları

HyperRez XP Karbonhidrat H⁺ kolonu ve Refraktif Indeks detektörü kitooligosakkarit standartlarını analiz etmek için kullanılmıştır (Hamer et al., 2015). Ancak, bu yöntem ile kitooligosakkarit standartlarının ayrılması sağlanamamış ve farklı oligomerlerin, aynı alıkonma süresi sonunda kolondan ayrıldığından başarılı olamamıştır. Farklı sıcaklıkları (23, 45 ve 50°C) ve farklı akış hızları (1 mL dk⁻¹, 0.4 mL dk⁻¹, 0.3 mL dk⁻¹ ve 0.1 mL dk⁻¹) denenmiştir fakat kitooligosakkaritleri ayırma işlemi gerçekleştirilememiştir. Tüm kitooligosakkaritlerin ayrı kromatogramları Ek 1'de verilmiştir.

Şekil 4.36'da gösterildiği gibi, 1 mL dk⁻¹ akış hızlarında, 45°C'de 5mM H₂SO₄ mobil faz ile yapılan analizlerin sonucunda kitooligosakkarit standartlarının ayırma işlemi gerçekleşmemiştir. Her bir oligomer standardı aynı alıkonma süresinin sonunda kolondan ayrılmıştır ve tüm standartlar 22,8 dakikada çıkmıştır. HyperRez XP Carbohydrate H⁺ kolonu ile elde edilen kitobiyoz, kitotrioz, kitotetraoz, kitopentoz ve kitoheksoz'un üst üste çakıştırıldığı HPLC kromatogramlarında görüldüğü gibi her bir oligosakkarit standardının kolonda aynı alıkonma süresine

sahip olması nedeniyle tüm standart kromatogramlarının üst üste konulduğu çakıştırılmış pikler ayırmanın gerçekleşmediğini ifade etmektedir.



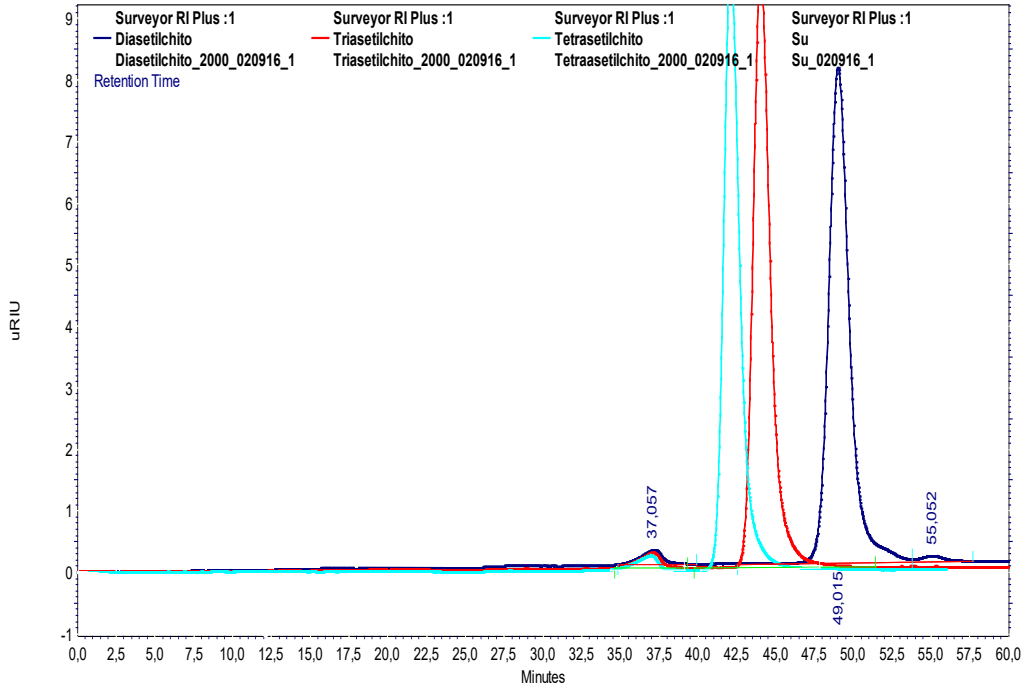
Şekil 4.36. HyperRez XP Carbohydrate H+ kolonu ile yapılan kitobiyoz, kitotrioz, kitotetroz, kitopentoz ve kitoheksoz analizlerinin üst üste çakıştırıldığı kromatogram.

4.5.1.2 Hypersil APS-2 Amino kolonu ile yapılan HPLC yöntem optimizasyon çalışmaları

Kitooligosakkarit standartlarının analizi, Hypersil APS-2 Amino kolonu ve UV dedektörü kullanılarak da gerçekleştirilmiştir. Farklı oranlarında (75:25; 70:30) asetonitril ve su mobil faz olarak kullanılmış ve analiz yüksek sıcaklıkta (90°C) gerçekleştirilmiştir. Ancak, bu yöntemle de kitooligosakkarit standartlarının ayrımı gerçekleştirilememiştir. Hypersil APS-2 Amino kolon ile kitooligosakkaritlerin verimli bir şekilde ayrıldığına dair literatürde sıkça kullanılmıştır (Chang et al., 2001; Ikegami et al., 2008; Olicón-Hernández et al., 2017; Qin et al., 2002). Fakat, çalışmamızda, literatürdeki yöntemler kullanılmasına rağmen kitooligosakkarit standartlarının bu kolonla ayrımı sağlanamamıştır. Bunun, çalışmamızda analiz için kullanılan standartların farklı fiziko kimyasal özelliklersebebiyle olduğu düşünülmektedir.

4.5.1.3 Phenomenex RNM-Carbohydrate Na⁺ kolonu ile yapılan HPLC yöntem optimizasyon çalışmaları

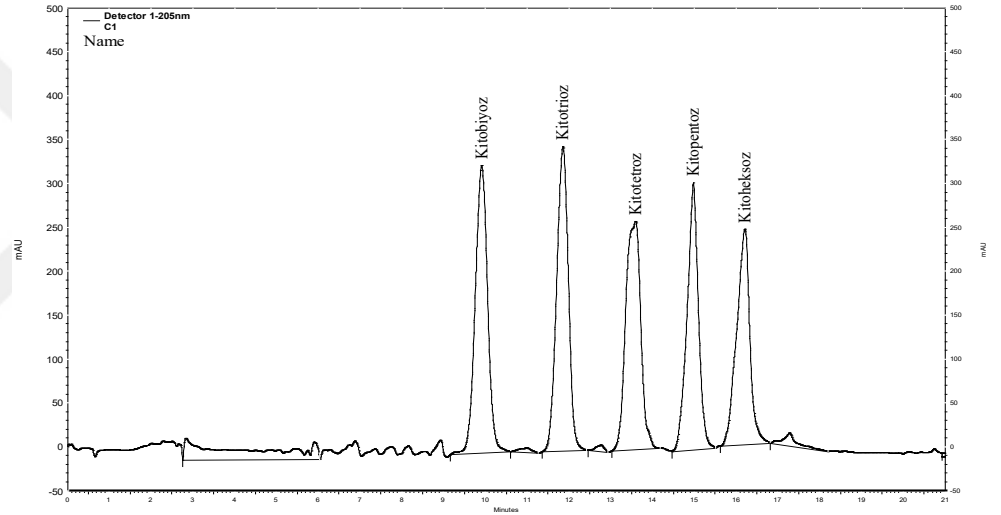
Çalışmamızda daha sonra üçüncü olarak Phenomenex RNM-Carbohydrate Na⁺ kolon ile 0,1 mL dk⁻¹ akış hızında mobil faz olarak ultra saf su (%100) kullanılarak 70°C'de yapılan ayırma ile kitobiyoz, kitotrioz ve kitotetroz için ayırma gerçekleşmiş fakat kitopentoz ve kitoheksoz için ayırma gerçekleştirilememiştir. Şekil 4.37'de gösterildiği gibi oligomerlerin alıkonma süresi birbirine çok yakındır. Kitotetrozun alıkonma süresi su pikinin alıkonma süresi ile çok yakın olduğundan bu kolonda kitobiyoz, kitotrioz, kitotetroz ayrılabilirken kitopentoz ve kitoheksoz birbirinden ayrılamamıştır. Analizlerin üst üste çakıştırıldığı kromotogramda kitooligosakkaritlerin alıkonma sürelerinin birbirine çok yakın olduğu ve kitotetrozun alıkonma süresinin suya yakın olduğu açıkça görülmektedir. Tüm kitooligosakkaritlerin ayrı kromatogramları Ek 2'de verilmiştir.



Şekil 4.37. Phenomenex RNM-Carbohydrate Na + kolonu ile yapılan kitobiyoz, kitotrioz ve kitotetroz analizlerinin üst üste çakıştırıldığı kromotogram.

4.5.1.4 Shodex Asahipak NH₂P-50 4E kolonu ile yapılan HPLC yöntem optimizasyon çalışmaları

İzokratik elüsyon yöntemleri kitooligosakkaritlerin analizi ve ayırımı için en sık kullanılmış yöntemlerden biri (Chang et al., 2001; Hamer et al., 2015; Olicón-Hernández et al., 2017; Qin et al., 2002), olmasına rağmen çalışmamızda (4.5.1.1, 4.5.1.2 ve 4.5.1.3) kitooligosakkarit standartlarını ayırmak için yeterli olmamıştır. Dolayısıyla, DAD dedektörü ile birlikte shodex Asahipak NH₂P-50 4E kolonu kullanılarak kitooligosakkarit analizi için bir gradyan yöntemi geliştirilmiştir ve bu yöntemi kullanılarak kitooligosakkarit standartlarının etkin bir şekilde ayrılması sağlanmıştır (Şekil 4.38).



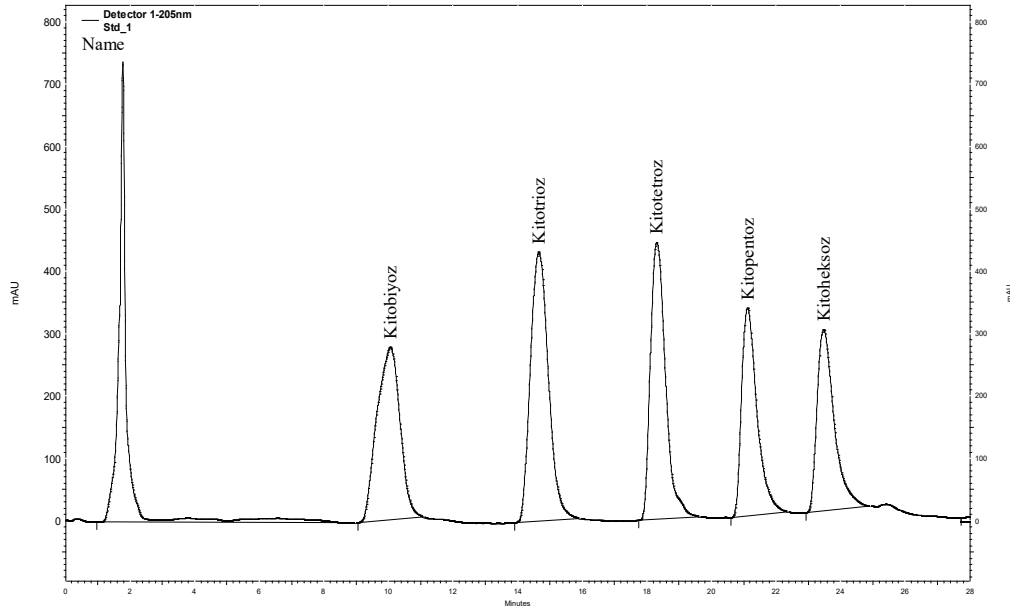
Şekil 4.38. Shodex Asahipak NH₂P-50 4E kolonu ile yapılan kitobiyoz, kitotrioz, kitotetroz, kitopentoz ve kitoheksoz analizlerinin HPLC kromotogramları.

Kitooligosakkaritlerin tekrarlayan analizlerinde tekrar edilebilir alıkonma sürelerinin elde edilmesi zor olduğu için bu yöntemin tamamen güvenilir olmadığı saptanmıştır. Alıkonma süresinin değişkenliğinin nedeni kolonun hidrofilik (HILIC) özellikleridir. Her bir HPLC denemesi (run) arasında kolonun dengelenme bozukluğunun, su tabakasının partikül yüzeyi üzerinde tam olarak yeniden kurulamamasına neden olabileceği ve bunun da tekrarlanamayan alıkonma sürelerine neden olabileceği düşünülmüştür. Daha önce belirlendiği üzere, HILIC kolonlarının düzgün bir şekilde dengelenmemesi, alıkonma sürelerinin sürüklenmesine ve zayıf tekrarlanabilirliğine neden olabilmektedir. Bununla birlikte, bazı durumlarda, hızlı

gradyanlar daha uzun süre aralıklarla tekrarlanırsa, sabit alıkonma süreleri ile dinamik bir dengeye ulaşmak mümkündür, ancak bu durumu her zaman elde etmek ve onun tekrarlanabilirliği oldukça zordur (Appelblad et al., 2008). Dolayısıyla, bu kolonu şartlandırmak için daha uzun süre gerekmektedir ve kolonun uzunluğuna göre daha fazla miktarda çözgen gerekmektedir. Bu tip dezavantajlardan dolayı, kolon daha sonraki deneyler için tercih edilmemiştir, ancak gradyan yönteminin kitooligosakkaritlerin analizi için en uygun olduğu belirlenmiştir ve sonraki analizler için gradyan yöntemi kullanmaya karar verilmiştir.

4.5.1.5 Hypersil APS-2 Amino kolonu ile yapılan HPLC yöntem optimizasyon çalışmaları

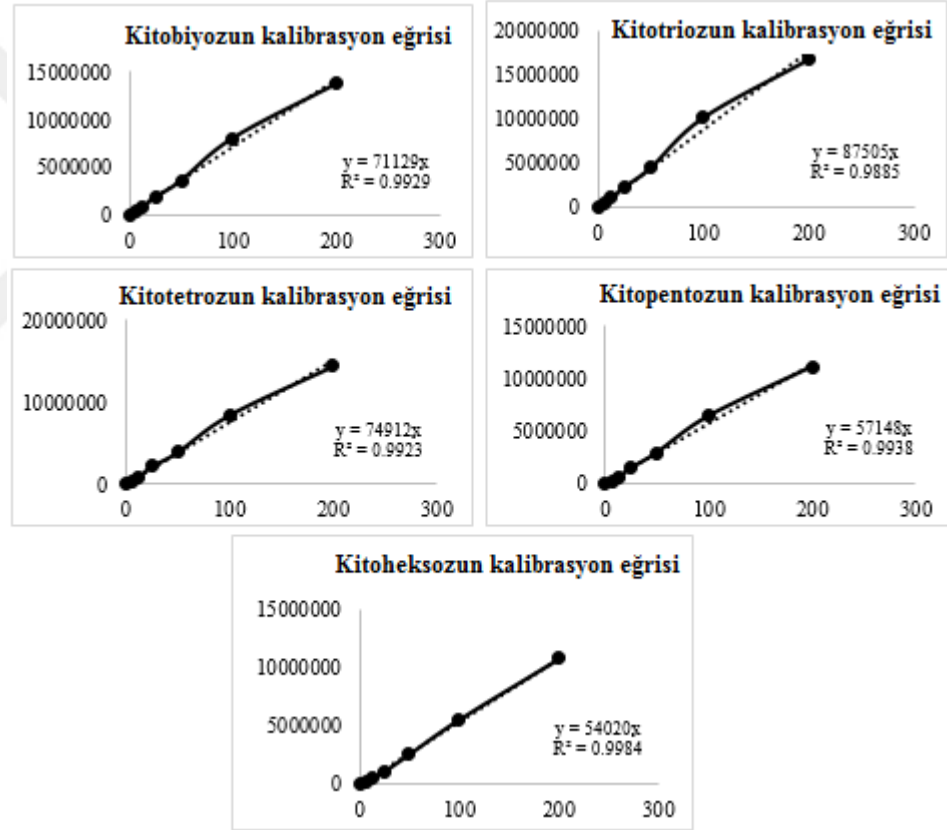
Hypersil APS-2 Amino kolonu ve DAD detektörü kullanılarak optimize edilmiş gradyent elüsyon yöntemi kitooligosakkarit analizi için uygulanmıştır. Bu kolonla birlikte gradyan yönteminin kullanılması iyi sonuç vermiş ve kitooligosakkaritlerin verimli bir şekilde ayrılması gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.39). Böylece, kitooligosakkarit standartlarının kalibrasyon eğrisi ve enzimatik olarak üretilen kitooligosakkaritlerin kantitatif analizinin gerçekleştirilmesi için Hypersil APS-2 Amino kolonu ve gradyan yöntemi seçilmiştir.



Şekil 4.39. Hypersil APS-2 Amino kolonu ile optimize edilmiş gradyan yöntemi kullanılarak yapılan kitobiyoz, kitotrioz, kitotetroz, kitopentoz ve kitoheksoz analizlerinin HPLC kromotogramları.

4.5.2 Optimize edilmiş HPLC yöntemiyle standartlara ait kalibrasyon eğrisinin çıkarılması

Kalibrasyon eğrisi, farklı konsantrasyonlarda (200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm 3,125 ppm ve 1,56 ppm) karışım formunda hazırlanan kitoooligosakkarit standartları (kitobiyoz, kitotrioz, kitotetoz, kitopentoz ve kitoheksoz) kullanılarak çıkarılmıştır. Her bir konsantrasyon için 4.5.1.5. de anlatıldığı şekilde optimize edilmiş HPLC yöntemi kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Veri noktaları, 0,992'lik R^2 değerleri ile doğrusal bir eğri vermiştir. Tespit limiti (limit of dedection, LOD) 3,125 ppm ve tayin limiti (limit of quantification, LOQ) 6,25 ppm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. Kitoooligosakkarit standartlarının kalibrasyon eğrileri.

4.5.3 Enzimatik olarak kitoooligosakkaritlerin üretimi

Kitosanın enzimatik hidrolizi, kimyasal yöntemlerden daha fazla tercih edilmektedir, ancak enzimatik hidrolizi ile DP, DD ve PA açısından iyi tanımlanmış

COS üretimi kesinlikle kolay değildir. Kitin ve kitosanın enzimatik veya kimyasal olarak hidroliz edilmesi sırasında, reaksiyon süresinin uzamasına bağlı olarak belirli bir oligomerin değil, bir oligomer karışımının oluşmasına neden olur. Kitosanın hidrolitik ürünleri, reaksiyon koşullarına bağlı olarak kitooligosakkarit (DP 1-7) karışımları olmakta ve reaksiyon süresinin uzamasının ardından monomerleri önemli bir son ürün halinde ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, her bir monomerin saflaştırılması için kromatografik ayırma gerekmektedir. (Jung and Park, 2014). Başlangıç kitosanının seçimi, enzimin seçimi ve işleme süresinin seçimi enzimatik hidrolizin sonucunu etkilemektedir. Dolayısıyla, bu parametreleri değiştirerek sonucu değiştirmek için her zaman olasılık bulunmaktadır (Aam et al., 2010). Bu nedenle, kitooligosakkaritlerin enzimatik üretiminde arzu edilen sonuçları elde etmek için optimizasyona ihtiyaç duyulmaktadır.

4.5.3.1 Kitosanın enzimatik hidrolizi

Bu çalışma, 16 farklı *Bacillus* suşunun kitosanaz enzimlerini, kitosanı hidroliz etme yetenekleri açısından taranması için tasarlanmıştır. Dolayısıyla, her bir enzimin saflaştırılması ve ardından kitooligosakkarit üretim potansiyelinin taranması mümkün olmamıştır. Bunun yerine, kitooligosakkarit üretimi için daha pratik ve ekonomik bir yaklaşım olan ham enzim ekstraktlarının kullanılması uygun bulunmuştur. Bu yaklaşım, daha önce birçok araştırmacı tarafından da kitooligosakkaritlerin sentezi için başarıyla kullanılmıştır (de Assis et al., 2010; Pagnoncelli et al., 2010). Çalışmanın başlangıcında, *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2'nin ham kitosanaz enzim çözeltisi, kitosan hidrolizini gerçekleştirerek hem kitooligosakkaritlerin sentezi için hem de HPLC analiz yöntemini optimize etmek üzere seçilmiştir. Ardından, diğer kitinolitik *Bacillus* suşlarının ham kitosanaz çözeltileri kullanılarak kitooligosakkaritlerin sentezi gerçekleştirilmiştir.

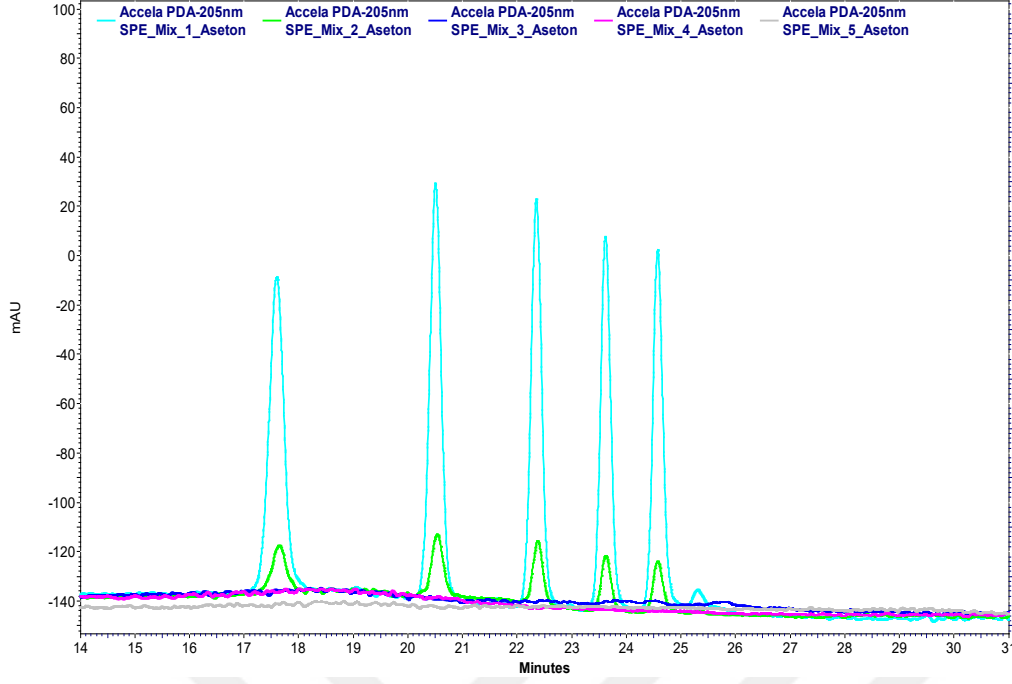
Çözünür kitosan, kitooligosakkaritlerin enzimatik sentezi için en çok tercih edilen substrat olmuştur ve birçok çalışmada, çözünür kitosandan kitooligosakkaritlerin üretimi rapor edilmiştir (Choi et al., 2004; de Assis et al., 2010). Ayrıca, çözünür kitosan, Çizelge 4.17'de gösterildiği gibi, çoğu kitosanazlar için en uygun substrattır. Bundan dolayı, çalışmamızda, kitooligosakkarit sentezinde, *Bacillus* suşlarının kitosanazlarının bir substratı olarak çözünür kitosan

kullanılmıştır. Çözünür kitosan, yüksek derecede viskoz bir çözeltilidir fakat bu çözeltinin viskozitesinde enzimatik hidrolizden sonra önemli ölçüde bir azalma, kitosanın onun türevlerine dönüşümünün bir göstergesi olarak kullanılabilir. Başlangıçta, ham enzim çözeltisiyle kitosan hidroliz sonucu elde edilen hidrolizatta, yüksek miktarlarda tuzların varlığı, kitooligosakkaritlerin ayrılmasını engellediği ve kolonun performansını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu nedenle, ham enzim ekstraktları, hidroliz reaksiyonunu gerçekleştirmeden önce tuzları gidermek için diyalize tabi tutulmuştur. Bu yaklaşımla HPLC ile kitooligosakkaritlerin ayrımı önemli ölçüde iyileştirilmiştir.

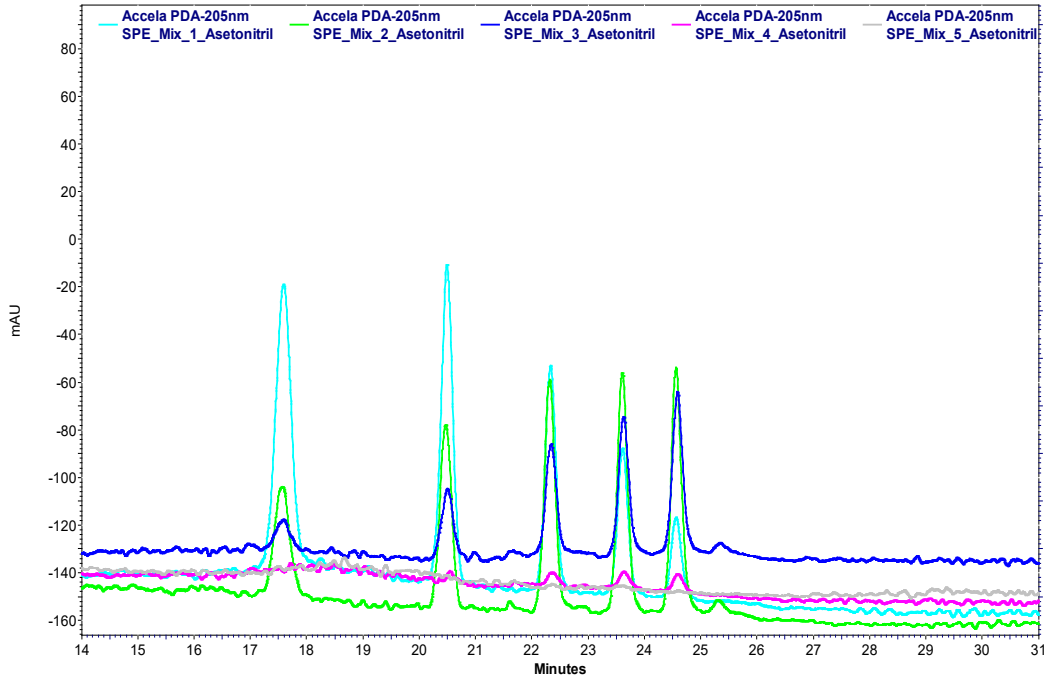
4.5.3.2 HPLC analizi için örneklerin hazırlanması

Ham enzim ekstraktlarında bulunan sekonder metabolitler, kitooligosakkaritlerin ayrımını azaltan olan bir diğer problem olarak karşılaşılmıştır. Bu nedenle örnekler katı faz ekstraksiyon (SPE) kolonundan geçirilerek sekonder metabolitlerin uzaklaştırılması ve hidrolizatın konsantre hale getirilmesi sağlanmıştır. SPE işlemi için en uygun çözügen seçimi için, kitooligosakkarit standartları ve örnekleri, farklı konsantrasyonda (%0-100) aseton, asetonitril ve metanol dahil olmak üzere farklı çözügenlere karşı test edilmiştir.

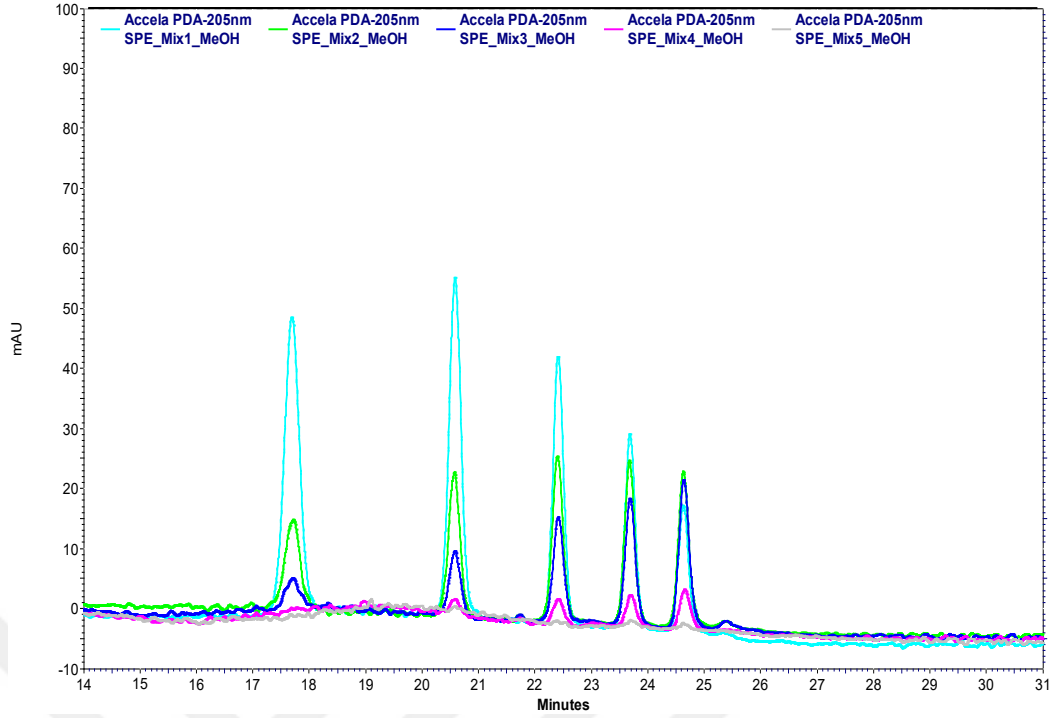
Katı faz ekstraksiyonunda çözügen olarak aseton kullanıldığında, kitooligosakkaritlerin büyük bir miktarı %10'luk asetonla kolondan ekstrakte edilmiş ve kalan miktar %20'lik asetonla tamamen ekstrakte edilmiştir (Şekil 4.41). %40'lık asetonitril ve %40'lık metanol kullanıldığında ise kitooligosakkaritleri tamamen ekstrakte edilmiştir (Şekil 4.42, Şekil 4.43). Ancak, bu iki çözügenin %40'lık konsantrasyonunda, reaksiyon karışımındaki bazı istenmeyen ikincil metabolitler de kitooligosakkaritler ile birlikte ekstrakte olmuştur. Bu nedenle, %20'lik aseton çözeltisi reaksiyon karışımında mevcut olan istenmeyen ikincil metabolitlerin maksimum miktarı tutulurken kitooligosakkarit karışımları tamamen ekstrakte edildiği için ham enzim ile hazırlanan kitosan hidrolizatlarını konsantre etmek için en iyi çözücü olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.41. Farklı konsantrasyonlarda aseton kullanılarak SPE kolonu ile konsantre edilmiş kitooligosakkarit karışımının HPLC kromatogramları. 1-%10, 2-%20, 3-%30, 4-%40, 5-%50.



Şekil 4.42. Farklı konsantrasyonlarda asetonitril kullanılarak SPE kolonu ile konsantre edilmiş kitooligosakkarit karışımının HPLC kromatogramları. 1-%10, 2-%20, 3-%30, 4-%40, 5-%50.



Şekil 4.43. Farklı konsantrasyonlarda metanol kullanılarak SPE kolonu ile konsantre edilmiş kitooligosakkarit karışımının HPLC kromatogramları. 1-%10, 2-%20, 3-%30, 4-%40, 5-%50.

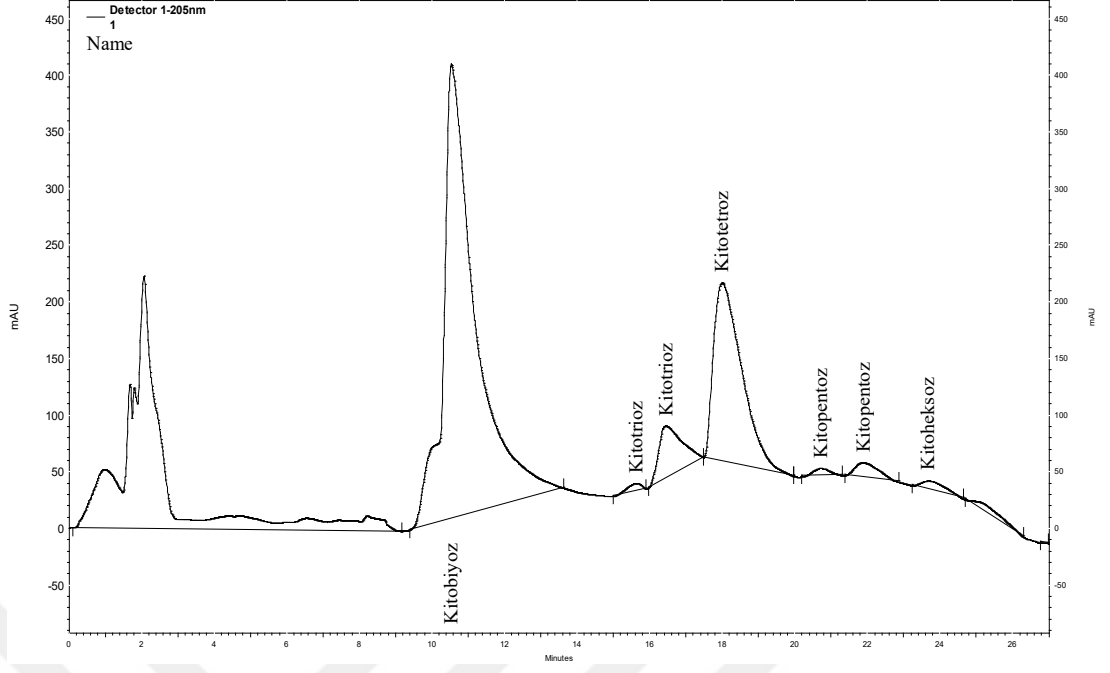
4.5.3.3 Ham kitosanaz çözeltileri kullanılarak kitosandan üretilen kitooligosakkaritlerin Hypersil APS-2 Amino kolonu ile yapılan HPLC analizi

Kitooligosakkaritler çoğunlukla kitin ve kitosanın kimyasal veya enzimatik hidrolizi ile elde edilir, ancak enzimatik hidroliz yöntemi, yüksek özgünlük, hafif reaksiyon koşulları ve kontrollü işleme nedeniyle biyoaktif COS sentezi için tercih edilmektedir (de Araújo et al., 2016). Kimyasal hidrolizden farklı olarak, kitin ve kitosanın enzimler tarafından biyolojik olarak parçalanması toksik kimyasalların kullanılmasını gerektirmemekte ve aşırı miktarda zararlı atık üretmemektedir. Bu nedenle, kitin ve kitosanı modifiye edici enzimler, biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalarda spesifik fonksiyonları ve güvenilir performansı ile kitin ve kitosanın mühendisliği için araçlar olarak gittikçe daha fazla ilgi görmeye başlamıştır (Nampally et al., 2015).

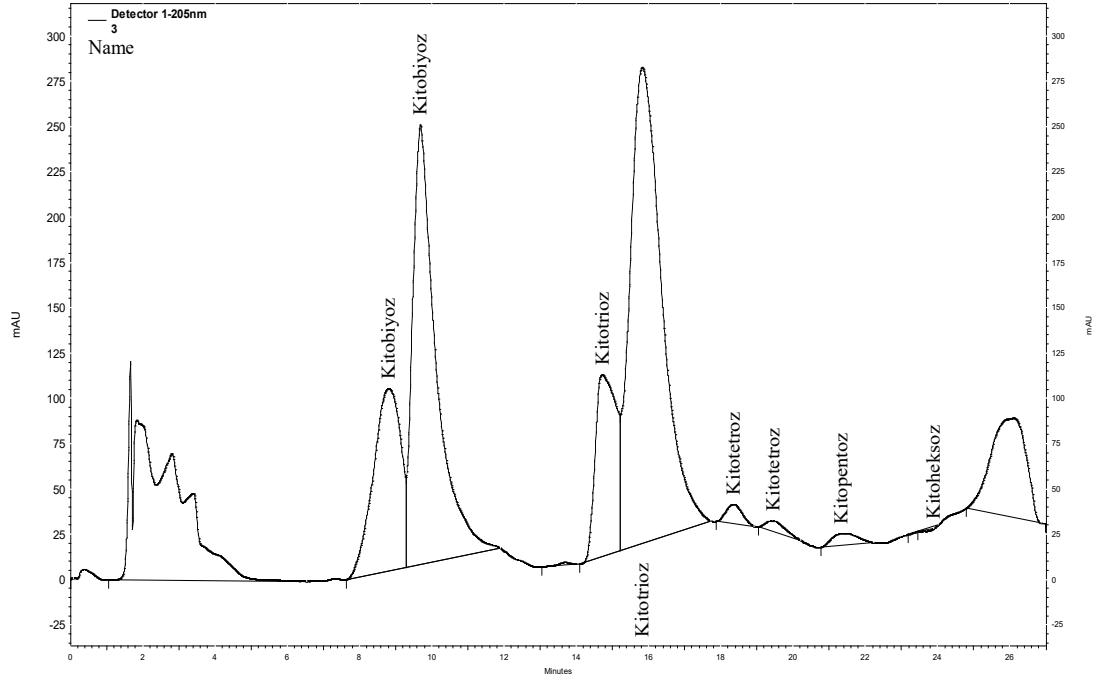
Bu çalışmada, kitosandan kitooligosakkaritlerin enzimatik üretimi, 16 kitinolitik *Bacillus* suşunun ham kitosanaz çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda yapılan tarama sonuçları, incelenen 14 *Bacillus*

suşunun kitooligosakkarit üretebildiğini ama *B. thuringiensis* EGE-B-14.1i ve *B. mycoides* EGE-B-36.1 olmak üzere iki suşun ham kitosanaz çözeltileriyle gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda hiçbir kitooligosakkarit ürünü tespit edilmediğini göstermiştir. Bu suşlar, HPLC yöntemimizin algılama limitinin dışında kalan çok düşük miktarda kitooligosakkarit üretmiş olabileceği düşünülmüştür. *Bacillus* suşlarının ham kitosanazçözeltileri ile kitosan hidrolizinin HPLC analizinin sonuçları Şekil 4.44 - Şekil 4.57'de gösterilmektedir.

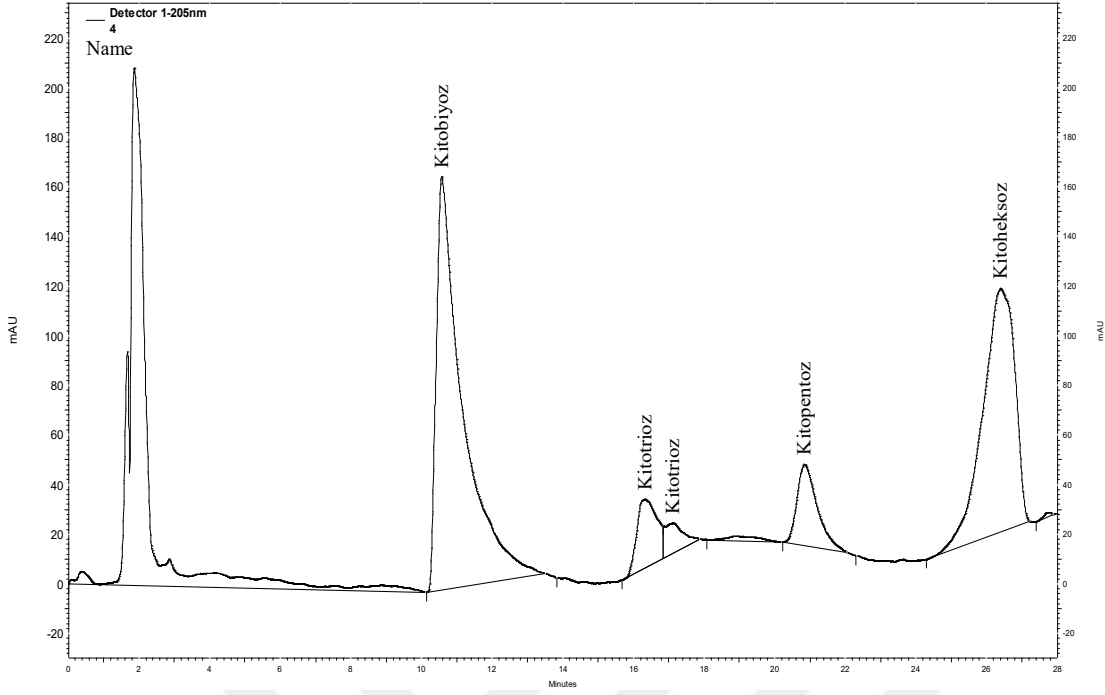
B. cereus EGE-B-6.1m, *B. thuringiensis* EGE-B-28.2, *B. cereus* EGE-B-2.5m, *B. cereus* EGE-B-5.5m, *B. cereus* EGE-B-10.4i, *B. thuringiensis* EGE-B-3.5m, *B. cereus* EGE-B-4.1i, *B. cereus* EGE-B-4.2i ve *B. mojavensis* EGE-B-5.2i'nin ham kitosanaz çözeltileri kitobiyoz, kitotrioz, kitotetroz, kitopentoz ve kitoheksoz üretmiştir. *B. thuringiensis* EGE-B-14.7i'nin ham kitosanaz çözeltisi kitobiyoz, kitotrioz, kitotetroz ve kitopentoz üretmiştir. *B. mycoides* EGE-B-19.3'un ham kitosanaz çözeltisi kitobiyoz, kitotrioz, kitopentoz ve kitoheksoz üretmiştir ve kitotetroz üretmemiştir. *B. mycoides* EGE-B-44.1'in ham kitosanaz çözeltisi kitobiyoz, kitotrioz ve kitoheksoz üretmiştir. *B. subtilis* EGE-B-36.5 and *B. subtilis* EGE-B-1.19'un ham kitosanaz çözeltisi kitobiyoz, kitotetroz ve kitoheksoz üretmiştir.



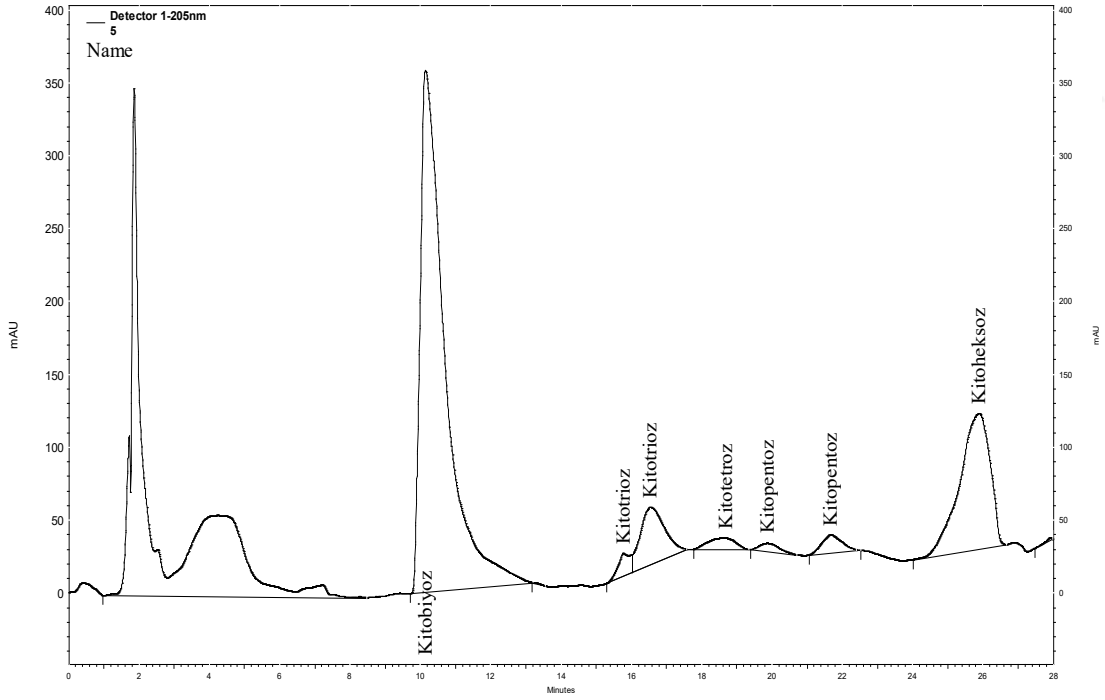
Şekil 4.44. *B. cereus* EGE-B-6.1m'in ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



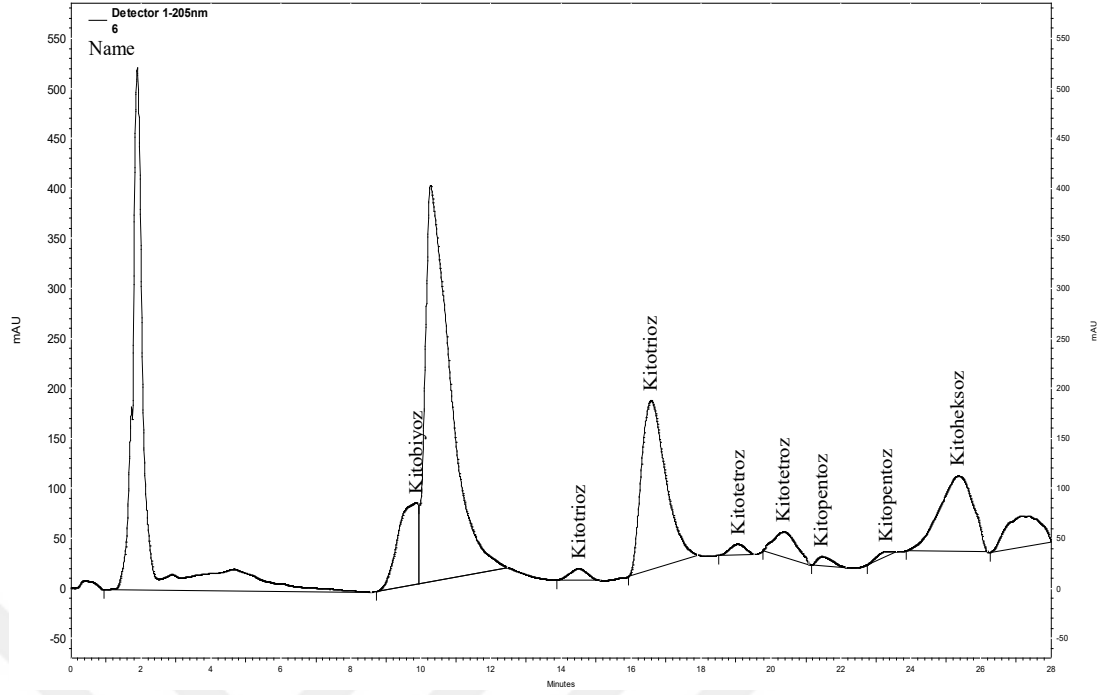
Şekil 4.45. *B. thuringiensis* EGE-B-14.7i'nin ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



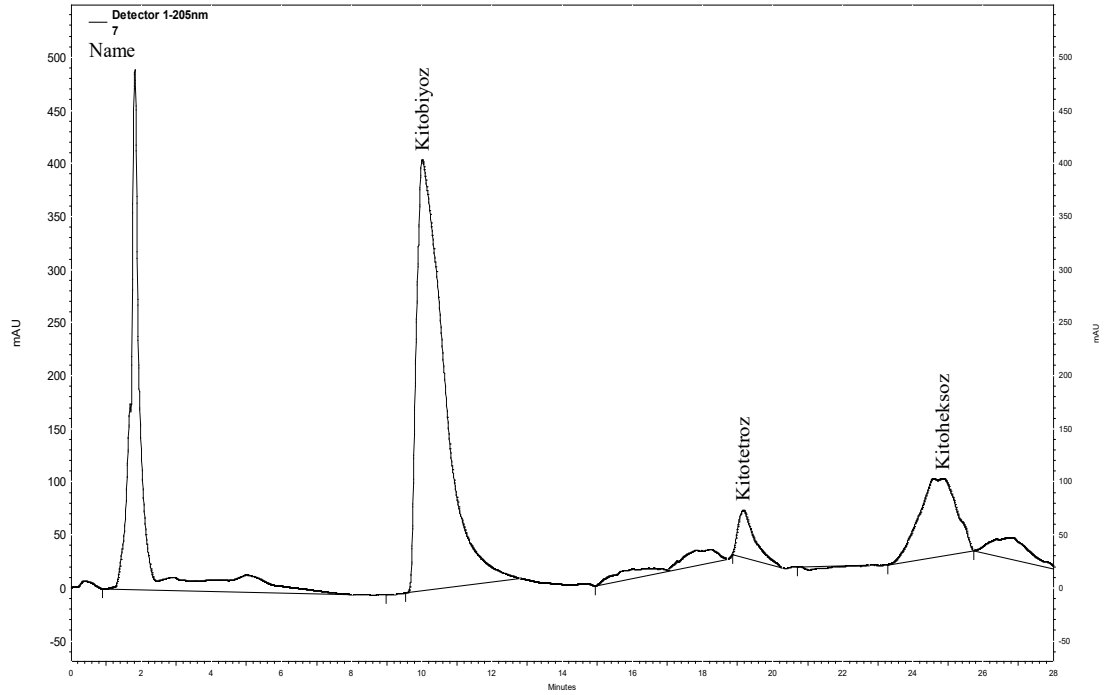
Şekil 4.46. *B. mycoides* EGE-B-19.3'un ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



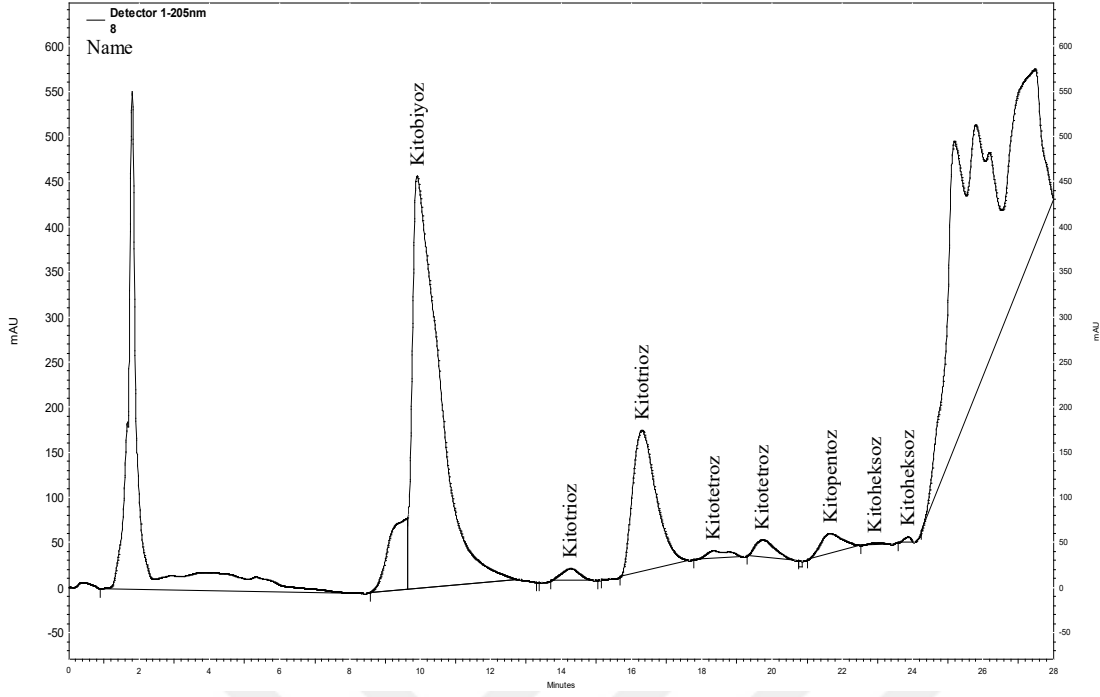
Şekil 4.47. *B. thuringiensis* EGE-B-28.2'nin ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



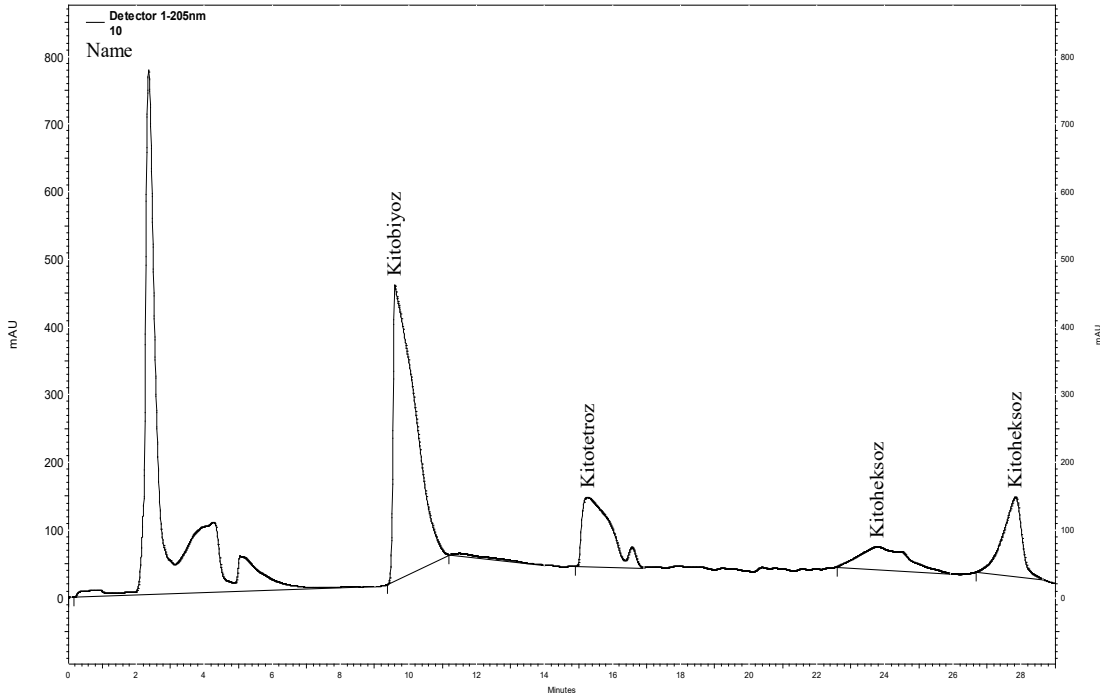
Şekil 4.48. *B. cereus* EGE-B-2.5m'in ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



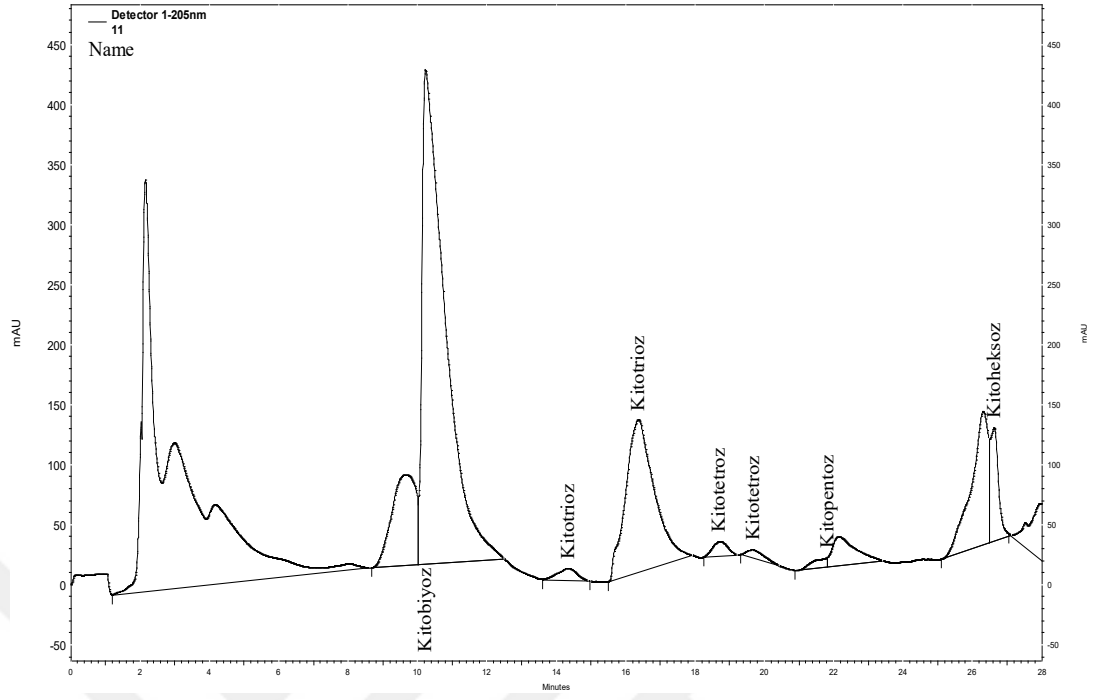
Şekil 4.49. *B. mycoides* EGE-B-44.1'in ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



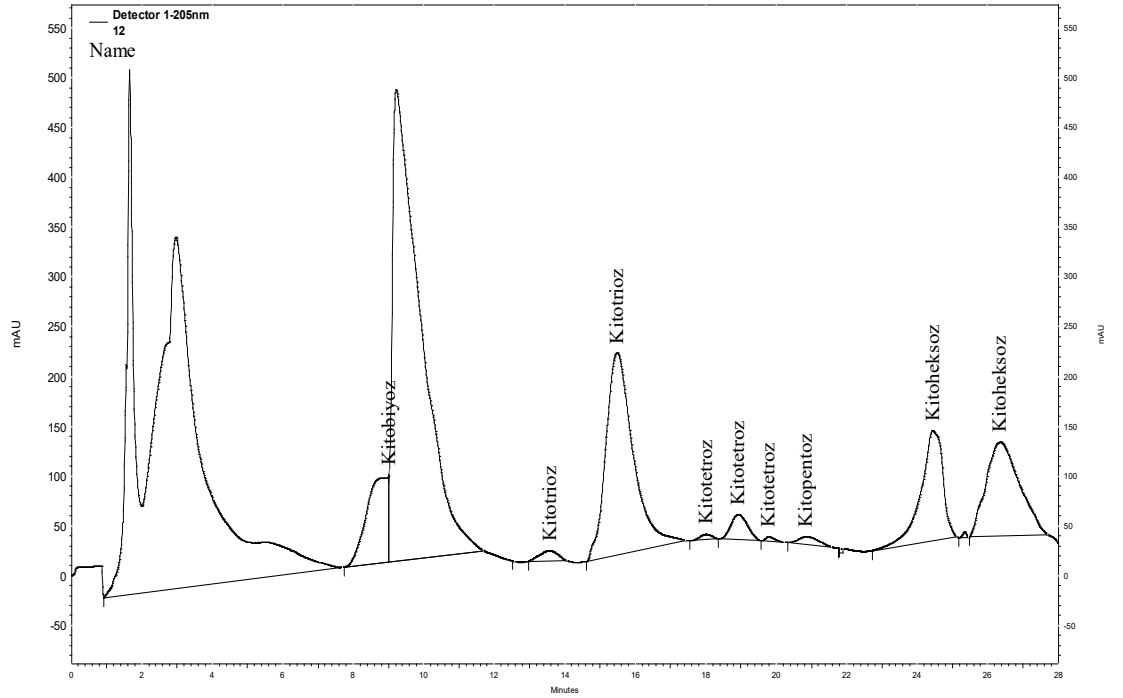
Şekil 4.50. *B. cereus* EGE-B-5.5m'in ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



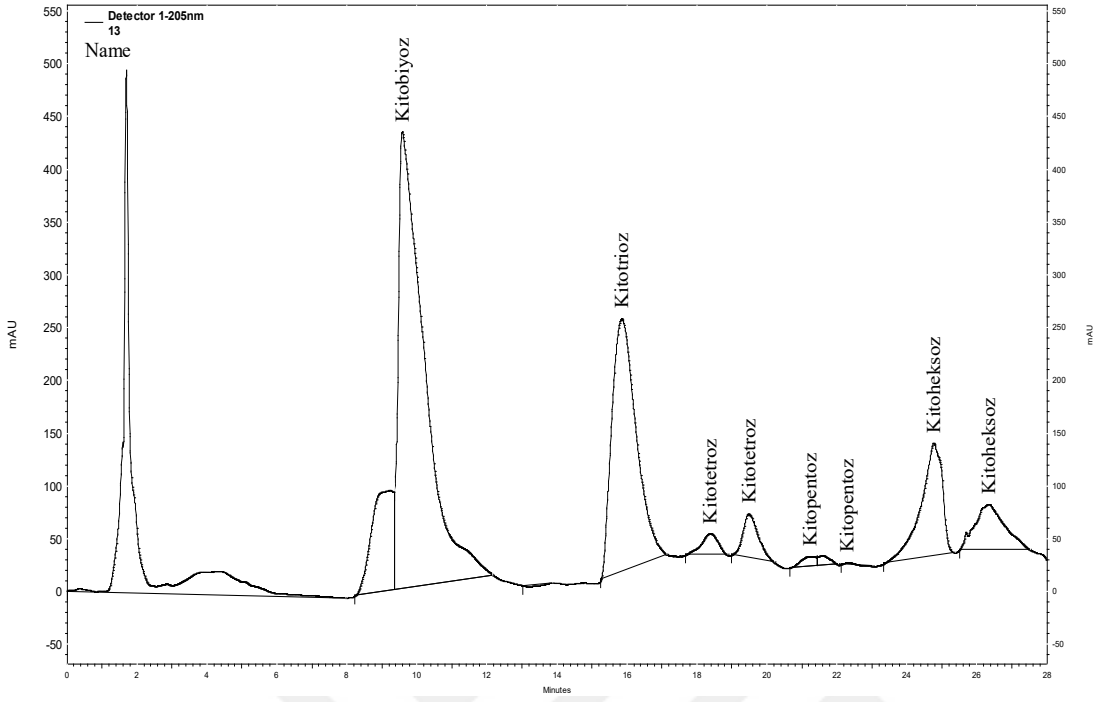
Şekil 4.51. *B. subtilis* EGE-B-36.5'in ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



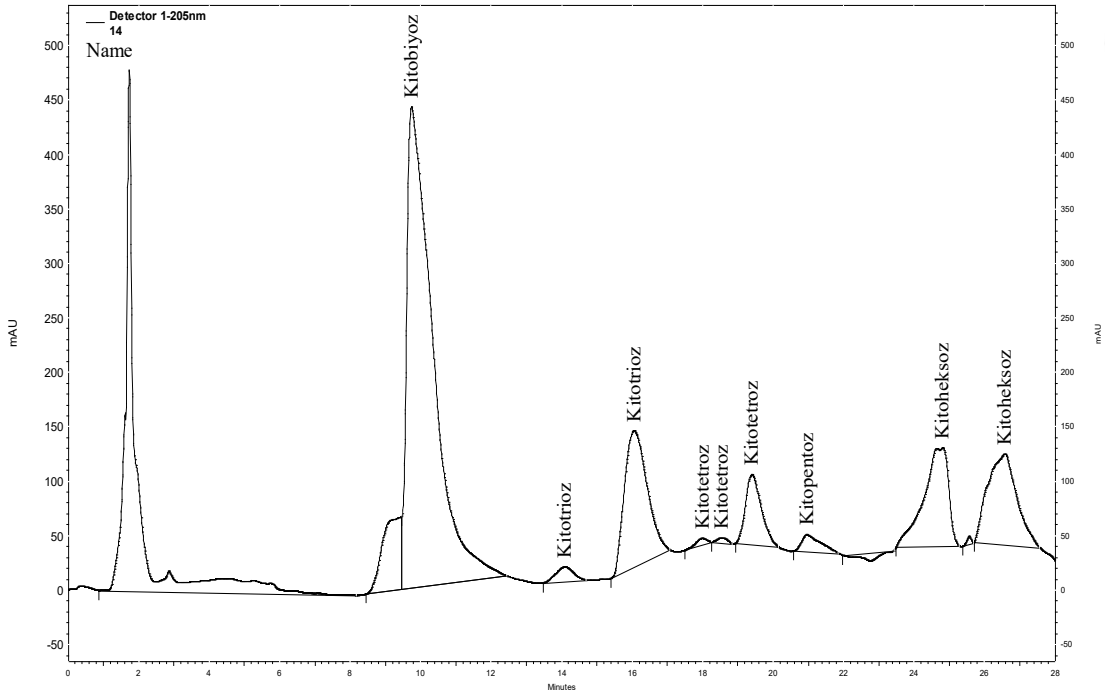
Şekil 4.52. *B. cereus* EGE-B-10.4i'nin ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



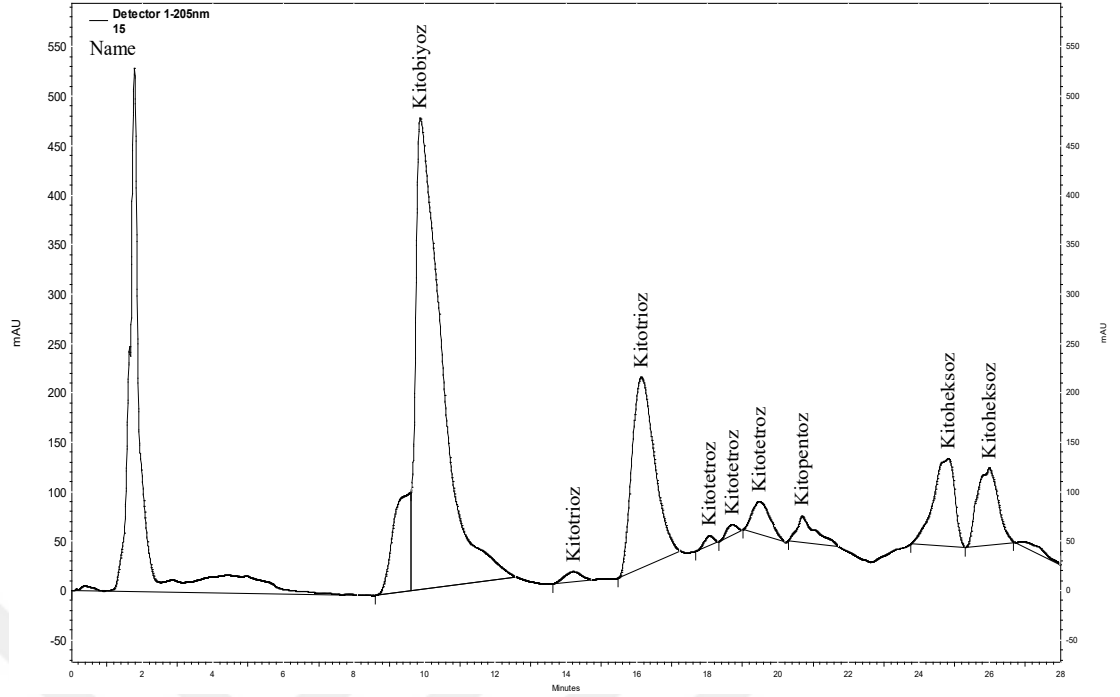
Şekil 4.53. *B. thuringiensis* EGE-B-3.5m'nin ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



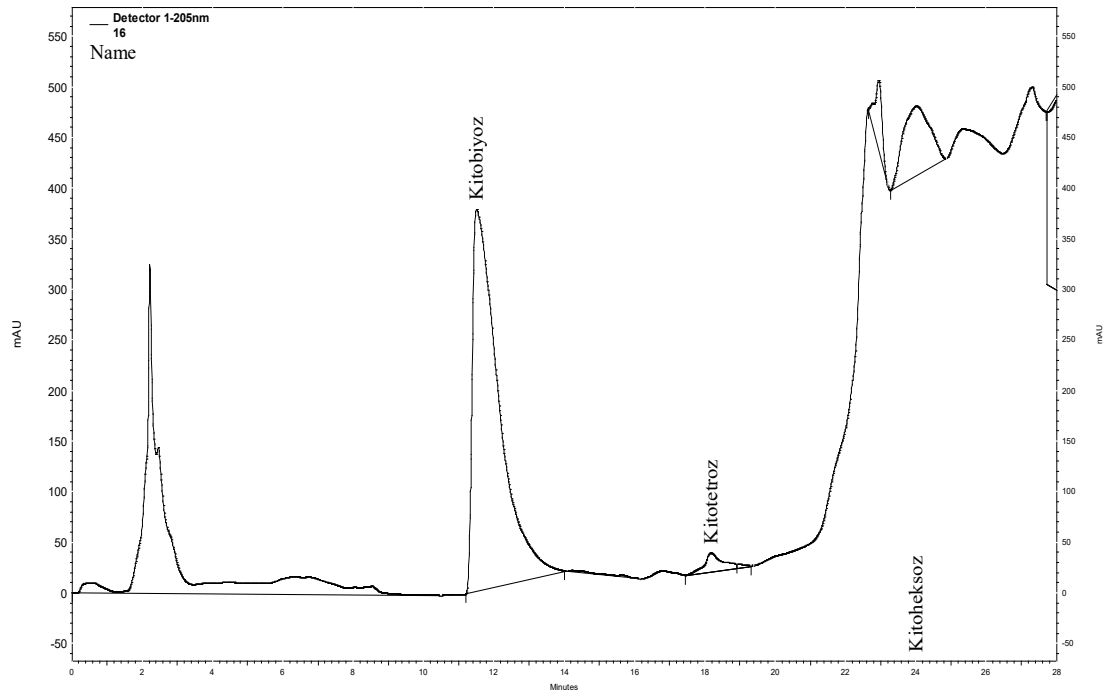
Şekil 4.54. *B. cereus* EGE-B-4.1'nin ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



Şekil 4.55. *B. cereus* EGE-B-4.2'nin ham kitosanaz çözeltisi ile üretilen kitooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



Şekil 4.56. *B. mojavensis* EGE-B-5.2i'nin ham kitosana çözeltisi ile üretilen kitoooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.



Şekil 4.57. *B. subtilis* EGE-B-1.19'un ham kitosana çözeltisi ile üretilen kitoooligosakkaritlerin HPLC kromatogramları.

Kitosan, nötr pH'ta düşük çözünürlüğe ve sulu çözeltilerde yüksek viskoziteye neden olan yüksek moleküler ağırlığa sahiptir. Kitosanın degradasyonu azalmış

moleküler ağırlık, düşük viskozite ve artırılmış çözünürlük ile sonuçlanır. Kitosan degradasyonunun mekanizması, glikozidik bağın parçalanması ile ilişkilidir, ve kitosan makromoleküllerin zinciri daha küçük birimler halinde gelmesi azalan viskoziteye neden olmaktadır (Rokhati ve diğerleri, 2017; Gohi ve diğerleri, 2016). Dolayısıyla, viskozitedeki azalma kitosan hidrolizin bir göstergesi olarak kullanılabilir. Bu çalışmada, enzimatik hidrolizden sonra reaksiyon karışımlarının viskozitesinde önemli bir düşüş gözlenirken, negatif kontrollerde viskozite azalması görülmemiştir.

Kitooligosakkaritlerin reaksiyon karışımından başarıyla ayrılması ve bunların yapısal karakterizasyonunun tamamlanması zorlu çalışmalardır. HPLC, kitooligosakkarit analizi ve ayrımı için sıklıkla kullanılmaktadır (Kumar, 2005; Li et al., 2012; Zou et al., 2015). Kitooligosakkaritlerin güçlü polaritesi ve zayıf ultraviyole (UV) Emilimi, analitik kolon ve dedektör seçimini belirlemektedir. Bu amaçla asetil grubunun varlığı nedeniyle COS'lar, HPLC ile genellikle UV dedektörü kullanılarak, yaklaşık 210 nm absorbansta ölçülerek izlenebilmektedir. Refraktif indeks dedektörü, N-asetillenmiş ve N-deasetillenmiş kitooligosakkaritlerin HPLC analizi için tercih edilmekte ancak düşük duyarlılığa sahiptir ve gradyan elüsyon için uygun değildir (Cao et al., 2016). Kitooligosakkaritlerin rutin HPLC yöntemleriyle ayrılması, esas olarak kitooligosakkaritlerin çok hidrofilik doğasından ve HPLC kolonu üzerindeki zayıf tutulumdan kaynaklanan bazı zorluklarla karşı karşıya kalmaktadır (Jiang et al., 2014).

Çalışmamızda enzimatik olarak üretilen kitooligosakkarit miktarları (ppm) ve bunların relatif verimleri Çizelge 4.18'de verilmiştir. Kitooligosakkarit ürünlerinin relatif verimleri %11 ile %31 aralığında değişmektedir ve *B. thuringiensis* EGE-B-3.5m'in kitosanazı maksimum relatif verimi (%31) vermiştir. İncelenen kitosanazların çoğunda, ana kitosan hidroliz ürünü, kitobiyozdur (14 adet suşta gözlenmiştir). Çalışmamızda kitosan hidrolizinin bir ürünü olarak monomer (glukozamin), tespit edilemediğinden test edilen enzimlerin hepsinin endo-kitosanaz olduğu düşünülmektedir. Daha önce, çeşitli araştırmacılar tarafından kitooligosakkaritlerin enzimatik üretimi konusunda bir çok çalışma yapılmış ve kitooligosakkaritlerin enzimatik üretimi (enzim, ürün, analiz yöntemleri) ile ilgili literatürlerin ayrıntılı analizi Çizelge 4.19'de, özetlenmiştir.

Çizelge 4.18. Farklı *Bacillus* suşlarının ham kitosaz enzim çözeltileri ile üretilen kitoologosakkaritler.

İzolat	Üretilen COS miktarları (ppm)												Toplam	Relatif verim (%)
	Kitobiyoz Homologları (DP 2)		Kitotrioz Homologları (DP 3)		Kitotetroz Homologları (DP 4)		Kitopentoz Homologları (DP 5)		Kitoheksoz Homologları (DP 6)					
	H1	H2	H1	H2	H1	H2	H1	H2	H1	H2				
<i>Bacillus cereus</i> EGE-B-6.1m	350,7	-	2,4	23,3	114,1	-	-	4,0	11,0	7,5	-	513,0	21	
<i>Bacillus thuringiensis</i> EGE-B-14.1i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus thuringiensis</i> EGE-B-14.7i	75,9	154,7	45,6	185,3	4,5	2,9	-	5,7	-	-	-	474,7	19	
<i>Bacillus mycoides</i> EGE-B-19.3	120,9	-	12,2	5,1	-	-	-	22,6	-	115,3	-	276,1	11	
<i>Bacillus thuringiensis</i> EGE-B-28.2	245,7	-	4,4	21,6	5,8	-	-	3,9	8,3	103,7	-	393,3	16	
<i>Bacillus cereus</i> EGE-B-2.5m	47,0	275,2	4,6	93,1	4,4	15,3	-	4,8	0,2	94,6	-	539,1	22	
<i>Bacillus mycoides</i> EGE-B-44.1	311,1	-	-	-	19,0	-	-	-	-	100,4	-	430,5	17	
<i>Bacillus cereus</i> EGE-B-5.5m	39,9	343,1	5,4	83,7	5,8	10,6	-	17,6	-	1,4	1,8	509,2	20	
<i>Bacillus mycoides</i> EGE-B-36.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-36.5	264,9	-	-	-	80,0	-	-	-	-	60,4	84,6	489,8	20	
<i>Bacillus cereus</i> EGE-B-10.4i	51,2	265,7	4,3	83,0	4,9	3,2	-	3,9	19,5	71,1	28,1	535,0	21	
<i>Bacillus thuringiensis</i> EGE-B-3.5m	51,2	367,8	5,2	124,3	1,6	11,0	1,2	5,7	-	89,1	114,6	771,7	31	
<i>Bacillus cereus</i> EGE-B-4.1i	57,6	313,5	133,0	-	9,1	17,1	-	5,2	3,9	84,8	47,7	672,0	27	
<i>Bacillus cereus</i> EGE-B-4.2i	34,2	320,3	5,5	64,0	1,7	1,2	26,7	10,1	-	82,0	87,3	633,0	25	
<i>Bacillus mojavensis</i> EGE-B-5.2i	46,8	344,4	3,7	98,3	2,4	3,0	15,9	16,6	-	69,2	58,9	659,1	26	
<i>Bacillus subtilis</i> EGE-B-1.19	274,7	-	-	-	4,1	-	-	-	-	67,1	-	345,9	14	

-, Tayin edilemedi. H1, H2, H3; Homologları.

Çizelge 4.19. Kitoooligosakkaritlerin enzimatik üretimi.

Mikroorganizma	Enzim	Reaksiyonu	Ürün	Analizi	Referans
<i>Bacillus</i> sp. HW-002	Kitosanaz	40°C'de, 5 saat kitosan kullanarak	(GlcN)2	HPLC	(Lee et al., 1996a)
<i>Bacillus</i> sp. KFB-C108	Kitosanaz	55°C'de, 12 saat kitosan kullanarak	(GlcN)3-(GlcN)5	HPLC	(Yoon et al., 1998)
<i>Matsuebacter chitosanotabidus</i> 3001	Kitosanaz	30°C'de, 10 dk kitosan kullanarak	(GlcN)2-(GlcN)6	TLC	(Park et al., 1999)
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>pakistani</i>	Ekzokitnaz	37°C'de, 24 saat koloidal kitin kullanarak	GlcNAc	TLC	(Thamthiankul et al., 2001)
<i>A. hydrophila</i> H-2330	Ham enzim	17°C'de, 10 gün, α -Kitin kullanarak	GlcNAc	HPLC, NH2P-50	(Sashiwa et al., 2003)
<i>Bacillus</i> sp.	Kitnaz	37°C'de 48 saat, koloidal kitin kullanarak	kitotrioz (GlcNAc)3	HPLC	(Woo and Park, 2003)
<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1	Kitnaz	70°C'de, 3 saat kitin kullanarak	(GlcNAc)2	TLC	(Tanaka et al., 2003)
<i>Bacillus</i> sp. KCTC 0377BP	Kitosanaz	Kitosan kullanarak	(GlcN)3-(GlcN)7	TLC/HPLC	(Choi et al., 2004)
<i>Bacillus cereus</i> S1	Kitosanaz	40°C'de, 20 dk. kitosan kullanarak	(GlcN)2, (GlcN)3, (GlcN)4	HPLC	(Kurakake et al., 2000)
<i>A. hydrophila</i> SUWA-9	Kitnaz	37°C'de, 24 saat kitin kullanarak	DP 2-5	TLC	(Lan et al., 2004)
<i>Aeromonas</i> sp. GJ-18	Ham enzim	45°C'de, 5 gün şişmiş kitin kullanarak	GlcNAc, (GlcNAc)2	HPLC, NH2P-50	(Kuk et al., 2005)
<i>Aeromonas</i> sp. GJ-18	Ham enzim	45°C'de, 7 gün, α - kitin ve β - kitin kullanarak	(GlcNAc)2	HPLC, NH2P-50 4E	(Kuk et al., 2006)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ham enzim	55°C'de çözünür kitosan kullanarak	(GlcN)2-(GlcN)5	HPLC	(de Assis et al., 2010)
<i>Bacillus cereus</i> TKU022	Proteaz	37°C'de, 2 gün	(GlcNAc)2 (GlcNAc)4	HPLC, MALDI-TOF MS	(Liang et al., 2012)
	Kitosanaz	kitin kullanarak	(GlcNAc)5, (GlcNAc)6	TOF MS	
<i>Streptomyces</i> sp.	Kitosanaz	60°C'de kitosan kullanarak	2-6 DP	TLC, HPTLC	(Sinha et al., 2012)
<i>Bacillus cereus</i> TKU027	Kitnaz	37°C'de, 2 saat, kitosan kullanarak	(GlcNAc/GlcN), DP 4-9, 2-5	MALDI-TOF MS	(Wang et al., 2012)
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Kitnaz	40°C'de, 6 gün buharda tutulan kitin kullanarak	GlcNAc DP 1-9	HPLC/MALDI-TOF MS	(Villa-Lerma et al., 2013)
<i>Penicillium decumbens</i> CFRNT15	Ekzokitosanaz	75 rpm'de karıştırılarak 42 $\pm$ 1°C'de koloidal kitosan kullanarak	D-glukosamin	TLC	(Nidheesh et al., 2015)
<i>Purpureocillium lilacinum</i> CFRNT12	Kitosanaz	37 $\pm$ 2°C'de 100 rpm karıştırmada	(GlcN)2-6	HPLC	(Thadathil et al., 2014)
<i>Bacillus</i> suşları	Ham kitosanazları	50°C'de 3 saat çözünür kitosan kullanarak	(GlcN)2-6	HPLC, Hypersil APS-2	Bu çalışına (Çizelge 4.18)

Enzimatik yöntemlerle sentezlenen kitooligosakkarit genellikle oligomerleri, homologları ve farklı MW'lerin izomerlerini içeren karmaşık bir karışım olarak elde edilmektedir. Dolayısıyla, HPLC yöntemleri ile bu tür kompleks karışımların analizi oldukça zor olmaktadır. Reaksiyon karışımında izomerlerin ve homologların bulunması, HPLC ile moleküllerin zayıf ayrılmasına ve düzensiz piklerin oluşumuna neden olur. Bu nedenle, çalışmamızda, daha kesin ve güvenilir sonuçlar elde etmek için farklı kolonlar, dedektörler ve yöntemler test edilmiştir. Enzimatik olarak üretilen kitooligosakkarit karışımlarının daha iyi ayrılabilmesi için gradyan elüsyon HPLC yöntemlerinin izokratik elüsyon yöntemlerine göre daha üstün olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada optimize edilmiş gradyan elüsyon yöntemi, kitosanın enzimatik hidrolizatında bulunan tüm oligomerlerin çok etkin bir şekilde ayrımı sağlanmıştır.

Ayrıca, piyasada bulunan ticari kitooligosakkarit standartları tamamen deasetilatlanmış veya tamamen asetillendirilmiştir. Ancak, kitosanın hidrolizi, rastgele GlcN ve GlcNAc parçalarını içeren kısmen asetillenmiş kitosan oligomerlerinin oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Liaqat ve Eltem, 2018). Çalışmamızda kullanılan kitosan %75-85 deasetillenmiştir, bu da kitosanın enzimatik hidrolizinden sonra üretilen kitosan oligomerlerinin kısmen asetile edildiği veya tamamen deasetil hale geldiği anlamına gelmektedir. Bu çalışmada kullanılan kitooligosakkarit standartları tamamen asetillenmiştir, bu nedenle kitooligosakkarit standartların alıkonma süreleri ve enzimatik olarak üretilen kitooligosakkaritlerin alıkonma süreleri tamamen aynı olmamıştır. Dolayısıyla, standartların ve örneklerin alıkonma sürelerindeki bu küçük farklılıklar, asetilasyon derecesi arasındaki farka atfedilebilir.

Çizelge 4.20. Çalışmamızda enzimatik olarak üretilen kitooligosakkaritlerin alıkonma süreleri.

Kitooligosakkarit standartları	Alıkonma süresi aralığı (dakika)
Kitobiyoz	9-13,7
Kitotrioz	13,8-17,5
Kitotetroz	17,6-19,8
Kitopentoz	20-22,8
Kitoheksoz	23-24,7

Hidrolizatlarda tespit edilen pikleri, onların alıkonma sürelerinin kitooligosakkarit standartlarının alıkonma süreleri ile benzerliklere dayanarak tanımlanmıştır. Örneğin, kitobiyoz standardının alıkonma süresi 9,9 dakikaydı (Şekil 4.39), bu nedenle, bu zamanın hemen öncesinde ve sonrasında görülen hidrolizatın pikleri kitobiyoz olarak adlandırılmıştır. Çizelge 4.20 çalışmamızda enzimatik olarak üretilen tüm kitooligosakkaritler için standartların alıkonma sürelerine bağlı olarak sabitlenmiş alıkonma süresinin aralıklarını göstermektedir. Elde ettiğimiz kitosan hidrolizatları aynı DP'ye sahip fakat farklı asetilasyon fraksiyonuna sahip olan oligomerlerin (DP 2-6) homologlarını içermektedir (Çizelge 4.18). Bu homologlar, HPLC kromatogramlarında farklı kitooligosakkarit standartlarına karşılık gelen farklı pikler şeklinde görülebilmektedir. Örneğin, çalışmamızda kitobiyoz alıkonma süresi aralığında birden fazla pik varlığı, kitobiyoz homologları olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde kitosan enzimatik hidrolizatlarında, kitotrioz, kitotetroz, kitopentoz ve kitoheksoz için de farklı homologları tespit edilmiştir (Çizelge 4.18). Kitooligosakkaritlerin karışımında aynı DP'ye sahip fakat farklı sayıda asetil gruplarına sahip homologları içerebileceğini destekleyen raporlar literatürde de bulunmaktadır. Kim et al. (2013), sıvı kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) analizi kullanılarak farklı DP'lerdeki kitooligosakkaritler için oligomer başına farklı asetilasyon sayıları gözlemlemiştir. Başka bir çalışmada, ¹H NMR spektroskopisi analizi ve MALDI TOF analizi ile karakterize edildiğinde *Streptomyces coelicolor*'ın bir kitosanaz, çeşitli kitosanları aynı DP'ler içindeki hem N-asetillenmiş hem de deasetillenmiş indirgeme uçları içeren kitooligosakkaritlere dönüştürme yeteneğini göstermiştir (Heggset et al., 2010).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kitooligosakkaritler, kitin ve kitosanın biyolojik olarak aktif türevleri olduğu için son derece değerlidir. Kitooligosakkaritler oldukça geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine ve çok sayıdaki endüstriyel uygulamalar için önemli bir potansiyele sahiptir. Kimyasal yöntemlere göre avantajlarından ötürü kitooligosakkaritler sentezinde kullanılan enzimatik yöntemler son birkaç yıldır büyük önem kazanmıştır, ancak kitinolitik enzimler ticari olarak temin edilememektedir. Bu nedenle, yeni kitinaz ve kitosanazların keşfedilmesi ve üretimlerinin optimizasyonu, bu enzimlerin ticari olarak bulunabilirliği ve bunların kitooligosakkaritlerin biyolojik üretiminde uygulamaları için yol açacaktır.

Bu çalışmada, 16 farklı yerel kitinaz ve kitosanaz ürettiği bilinen *Bacillus* suşunun kitin ve kitosan varlığında kitinaz ve kitosanaz üretimleri incelenmiştir. Yapılan incelemelerde, *Bacillus* suşlarının kitosanaz aktivitelerinin, kitinaz aktivitelerine kıyasla daha yüksek olduğu belirlendiğinden, daha ileri çalışmalar için kitosanaz enzimi kullanılmıştır. Kitosanaz üretiminin optimizasyon çalışmaları için bir suş (*Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i) seçilmiş ve fermantasyon ortamının istatistiksel optimizasyonundan sonra enzim üretimi önemli ölçüde arttırılmıştır (9,5 kat). *B. mojavensis* EGE-B-5.2'nin kitosanaz üretimi için optimal fermantasyon ortamı olarak 7,5 g L⁻¹ çözünür nişasta, 6,5 g L⁻¹ koloidal kitosan, 7,5 g L⁻¹ pepton ve 3,5 g L⁻¹ NaCl içeren bir ortam belirlenmiştir..

Kitosanazın anahtar özelliklerini açıklamak için, enzimin kısmi saflaştırılması tek adımlı bir iyon değişim kromatografisiyle gerçekleştirilmiştir ve 37 kDa'lık bir kitosanaz elde edilmiştir. Saflaştırılmış kitosanaz 159,6 U mg⁻¹ spesifik aktiviteye sahiptir ve %39,3'lük geri kazanma ile 5,9 kat saflaştırma elde edilmiştir. Saflaştırılmış kitosanazın optimum sıcaklığı ve pH değeri sırasıyla 55°C ve 5,5 olarak belirlenirken enzimin, 55°C'de bir saat boyunca %66'luk kalan aktivite ile geniş bir pH aralığında (3-11) stabilitesini koruduğu saptanmıştır. Kitosanazın aktivitesi Mn²⁺ ve K⁺ ile çok hafif aktive edilmiştir ve Hg²⁺, Cu²⁺, SDS ve EDTA ile önemli ölçüde inhibe edilmiştir. Kitosanaz için optimum substratın çözünür

kitosan olduğu ve enzimin çözünür kitosan ile K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,1 mg mL⁻¹ ve 244,5 µmol min⁻¹ mg⁻¹ olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda, kitooligosakkaritlerin enzimatik üretimi için, tüm *Bacillus* suşlarının ham kitosanaz enzim çözeltileri, kitosani hidrolize etmek için kullanılmıştır. Başlangıçta, kitooligosakkaritlerin ayrıştırılması ve kantitatif analizi için HPLC yöntemi, kitooligosakkarit standartları kullanılarak optimize edilmiştir. Daha sonra bir gradient elüsyon yöntemi belirlenmiş ve kitooligosakkarit standartların kalibrasyon eğrileri ile enzimatik olarak üretilen kitooligosakkaritlerin kantitatif analizi yapılmıştır. 14 *Bacillus* suşuna ait ham kitosanaz çözeltileri kitosani başarıyla kitooligosakkaritlere hidroliz etmiş ve hidrolizatte hidroliz ürünü olarak en fazla kitobiyoz ve kitotrioz olmak üzere DP 2-6 arasında değişen farklı oligomerler saptanmıştır (Çizelge 4.18). *Bacillus* suşlarının ham kitosanaz çözeltileri kullanılarak yapılan hidroliz ürünleri arasında glukosamin monomeri bulunamadığından, kitooligosakkarit oluşturan tüm enzimlerin endo-kitosanaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamız sonuçları, incelenen ham kitosanaz çözeltilerinin doğrudan kitosanın kitooligosakkaritlere etkin biyolojik dönüşümü için kullanılabileceğini ve bu enzimlerin biyolojik olarak aktif kitooligosakkaritlerin büyük ölçekli üretimi için avantajlı olacağını ortaya koymuştur.

Dahası, bu çalışma kapsamında belirlenmiş olan HPLC analiz yönteminin, kitooligosakkarit karışımının verimli bir şekilde ayrılmasını sağlamak için elverişli olmasına rağmen, sonuçların doğrulanması ve oligomerlerin tam yapısal karakterizasyonu için, LC-MS, MALDI-TOF-MS ve NMR gibi bazı ileri tekniklerin uygulanması gerekmektedir. Ayrıca enzimatik olarak sentezlenen kitooligosakkaritlerin tam olarak karakterizasyonu yapıldıktan sonra biyolojik aktivesinin incelenmesi de oldukça önemlidir.

Gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerin faydalı biyolojik aktivitelere sahip yeni bileşiklere ihtiyacı vardır ve yapılan çalışmalarda kitooligosakkaritlerin biyoaktif maddeler olarak umut verici potansiyelleri rapor edilmiştir. Biyolojik faaliyetlerini keşfetmeden önce, kitooligosakkaritlerin kitlesel üretimi ve üretilen

kitooligosakkaritlerin fizikokimyasal açısından ayrıntılı sınıflandırılması, doğru karakterizasyon, fizikokimyasal özelliklerinin yorumlanması ve biyolojik faaliyetlerine en uygun uygulamalarını öngörmek için son derece önemlidir.

Kitooligosakkarit kullanımına eşlik eden az sayıda kısıtlama vardır. Kitooligosakkaritlerin büyük ölçekli üretimi için yeni bir yöntem geliştirmek hala son derece zorlayıcı bir konudur. Kitooligosakkaritlerin fizikokimyasal özelliklerini belirlemek için çeşitli yöntemler mevcuttur. Ancak bu yöntemler saf standartları gerektirmektedir. Mevcut saf standartlar oldukça pahalıdır ve uygulamada DP 6'dan yüksek olan standartlar bulunamadığı için kullanılamamaktadır. Bu nedenle DP 6'dan daha büyük olan kitooligosakkarit ürünlerini doğru bir şekilde analiz etmek henüz mümkün değildir. Bu alanda yürütülen birçok çalışmaya rağmen saflaştırılmış ve iyi karakterize edilmiş kitooligosakkarit ürünlerinin üretimi hala zor bir süreçtir. İlerleme stratejilerinin varlığı bile olsa, tek bir kitooligosakkaritin üretimi hala uzak bir rüyadır. Enzimatik kitooligosakkarit üretim yöntemleri, kitooligosakkaritlerin fizikokimyasal özelliklerini korumak ve kontrol etmek için nispeten daha faydalıdır. Kitooligosakkaritlerin DP, DA, MW ve katyonik yapısı biyolojik faaliyetlerini doğrudan etkileyen fizikokimyasal özellikleridir. Fizikokimyasal özelliklerin farklı biyolojik aktiviteler üzerindeki net etkileri ve biyolojik aktiviteler için moleküler mekanizmalar daha az bilinmektedir.

Tam karakterize edilmiş kitooligosakkarit üretimi ve gelecekteki araştırmalarda moleküler mekanizmaların teyit edilmesi, kitooligosakkaritlerin olası uygulamaları ve potansiyeli hakkında bir fikir sağlayacaktır. Günümüzde kitooligosakkaritlerin yüksek saflıkta üretimi, üretilen ürünlerin doğru karakterizasyonu, üretim veriminin artırılarak maliyetin düşürülmesi bu alanda çalışan bilim insanlarının temel amacıdır. Kitooligosakkaritlerin biyolojik önemi, üretim, saflaştırma ve karakterizasyon için yeni teknolojilerin araştırılmasını gerektirmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aam, B.B., Heggset, E.B., Norberg, A.L., Sørle, M., Vårum, K.M., Eijsink, V.G.,** 2010, Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine, *Marine Drugs*, 8(5):1482-1517 pp.
- Akhavan Sepahy, A., Ghazi, S., Akhavan Sepahy, M.,** 2011, Cost-effective production and optimization of alkaline xylanase by indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 fermented on agricultural waste, *Enzyme research*, 2011pp.
- Allan, C.R., Hadwiger, L.A.,** 1979, The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition, *Experimental Mycology*, 3(3):285-287 pp.
- Appelblad, P., Jonsson, T., Pontén, E., Viklund, C., Jianf, W.,** 2008, A practical guide to HILIC, *Merck SeQuant AB, Sweden*:11 pp.
- Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., Amrane, A.,** 2013, Chitin extraction from crustacean shells using biological methods-a review, *Food Technology and Biotechnology*, 51(1):12 pp.
- Artan, M., Karadeniz, F., Karagozlu, M.Z., Kim, M.-M., Kim, S.-K.,** 2010, Anti-HIV-1 activity of low molecular weight sulfated chitooligosaccharides, *Carbohydrate Research*, 345(5):656-662 pp.
- Azuma, K., Osaki, T., Kurozumi, S., Kiyose, M., Tsuka, T., Murahata, Y., Imagawa, T., Itoh, N., Minami, S., Sato, K.,** 2015, Anti-inflammatory effects of orally administered glucosamine oligomer in an experimental model of inflammatory bowel disease, *Carbohydrate Polymers*, 115:448-456 pp.
- Bahar, B., O'Doherty, J.V., Maher, S., McMorrow, J., Sweeney, T.,** 2012, Chitooligosaccharide elicits acute inflammatory cytokine response through AP-1 pathway in human intestinal epithelial-like (Caco-2) cells, *Molecular Immunology*, 51(3):283-291 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bahrke, S.** 2007, Mass spectrometric analysis of chitooligosaccharides and their interaction with proteins. PhD Thesis, University of Potsdam, Germany, URL: <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/2017/>.
- Bahrke, S., Einarsson, J.M., Gislason, J., Haebel, S., Letzel, M.C., Peter-Katalinić, J., Peter, M.G.,** 2002, Sequence analysis of chitooligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization postsorce decay mass spectrometry 1, *Biomacromolecules*, 3(4):696-704 pp.
- Beaudoin, M.E., Gauthier, J., Boucher, I., Waldron, K.C.,** 2005, Capillary electrophoresis separation of a mixture of chitin and chitosan oligosaccharides derivatized using a modified fluorophore conjugation procedure, *Journal of separation science*, 28(12):1390-1398 pp.
- Beg, Q.K., Gupta, R.,** 2003, Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*, *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2):294-304 pp.
- Benhabiles, M., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M., Mameri, N.,** 2012, Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste, *Food Hydrocolloids*, 29(1):48-56 pp.
- Bisswanger, H.,** 2014, Enzyme assays, *Perspectives in Science*, 1(1-6):41-55 pp.
- Blanes, L., Saito, R.M., Genta, F.A., Donegá, J., Terra, W.R., Ferreira, C., do Lago, C.L.,** 2008, Direct detection of underivatized chitooligosaccharides produced through chitinase action using capillary zone electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, 373(1):99-103 pp.
- Bosquez-Molina, E., Zavaleta-Avejar, L.,** 2016, New Bioactive Biomaterials Based on Chitosan, *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*:33 pp.
- Braconnot, H.,** 1811, Sur la nature des champignons, *Ann Chim Phys*, 79:265-304 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Cao, L., Wu, J., Li, X., Zheng, L., Wu, M., Liu, P., Huang, Q.,** 2016, Validated HPAEC-PAD method for the determination of fully deacetylated chitooligosaccharides, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10):1699 pp.
- Chang, K.L.B., Tai, M.-C., Cheng, F.-H.,** 2001, Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10):4845-4851 pp.
- Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A., Chatterjee, B.,** 2005, Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization, *Process Biochemistry*, 40(1):395-400 pp.
- Chen, J., CHEN, X.-e., FANG, X.-b., YU, H.,** 2011, Optimization of Chitosanase Production from *Bacillus thuringiensis* ZJOU-010 by Response Surface Methodology [J], *Food Science*, 5:039 pp.
- Cheng, S., Wang, Y., Hong, B.,** 2012, Statistical optimization of medium compositions for chitosanase production by a newly isolated *Streptomyces albus*, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(4):691-698 pp.
- Chiang, C.-L., Chang, C.-T., Sung, H.-Y.,** 2003, Purification and properties of chitosanase from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1, *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2):260-267 pp.
- Choi, B.-K., Kim, K.-Y., Yoo, Y.-J., Oh, S.-J., Choi, J.-H., Kim, C.-Y.,** 2001, In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18(6):553-557 pp.
- Choi, W.-S., Ahn, K.-J., Lee, D.-W., Byun, M.-W., Park, H.-J.,** 2002, Preparation of chitosan oligomers by irradiation, *Polymer Degradation and Stability*, 78(3):533-538 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Choi, Y.J., Kim, E.J., Piao, Z., Yun, Y.C., Shin, Y.C.,** 2004, Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8):4522-4531 pp.
- Chung, M.J., Park, J.K., Park, Y.I.,** 2012, Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE–antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice, *International Immunopharmacology*, 12(2):453-459 pp.
- Chung, Y.-C., Su, Y.-P., Chen, C.-C., Jia, G., Wang, H.-l., Wu, J.G., Lin, J.-G.,** 2004, Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall, *Acta Pharmacologica Sinica*, 25:932-936 pp.
- da Silva, L.C., Honorato, T.L., Franco, T.T., Rodrigues, S.,** 2012, Optimization of chitosanase production by *Trichoderma koningii* sp. under solid-state fermentation, *Food and Bioprocess Technology*, 5(5):1564-1572 pp.
- Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S.,** 2006, Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6):773-782 pp.
- Dai, D., Hu, W., Huang, G., Li, W.,** 2011, Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1, *African Journal of biotechnology*, 10(13):2476-2485 pp.
- Day, R.B., Shibuya, N., Minami, E.,** 2003, Identification and characterization of two new members of the GRAS gene family in rice responsive to N-acetylchitooligosaccharide elicitor, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1625(3):261-268 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- de Araújo, N.K., Pagnoncelli, M.G.B., Pimentel, V.C., Xavier, M.L.O., Padilha, C.E.A., de Macedo, G.R., dos Santos, E.S.,** 2016, Single-step purification of chitosanases from *Bacillus cereus* using expanded bed chromatography, *International Journal of Biological Macromolecules*, 82:291-298 pp.
- de Assis, C.F., Araújo, N.K., Pagnoncelli, M.G.B., da Silva Pedrini, M.R., de Macedo, G.R., dos Santos, E.S.,** 2010, Chitooligosaccharides enzymatic production by *Metarhizium anisopliae*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(7):893-899 pp.
- de Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H., Thomma, B.P.,** 2010, Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants, *Science*, 329(5994):953-955 pp.
- Dong, H., Wang, Y., Zhao, L., Zhou, J., Xia, Q., Jiang, L., Fan, L.,** 2014, Purification of DP 6 to 8 chitooligosaccharides by nanofiltration from the prepared chitooligosaccharides syrup, *Bioresources and Bioprocessing*, 1(1):20 pp.
- Dong, X., Shen, A., Gou, Z., Chen, D., Liang, X.,** 2012, Hydrophilic interaction/weak cation-exchange mixed-mode chromatography for chitooligosaccharides separation, *Carbohydrate Research*, 361:195-199 pp.
- Dos Santos, A.L.W., El Gueddari, N.E., Trombotto, S., Moerschbacher, B.M.,** 2008, Partially acetylated chitosan oligo-and polymers induce an oxidative burst in suspension cultured cells of the gymnosperm *Araucaria angustifolia*, *Biomacromolecules*, 9(12):3411-3415 pp.
- Dou, J., Xu, Q., Tan, C., Wang, W., Du, Y., Bai, X., Ma, X.,** 2009, Effects of chitosan oligosaccharides on neutrophils from glycogen-induced peritonitis mice model, *Carbohydrate Polymers*, 75(1):119-124 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ekowati, C., Hariyadi, P., Witarto, A.B., Hwang, J.K., Suhartono, M.T.,** 2006, Biochemical characteristics of chitosanase from the Indonesian *Bacillus licheniformis* MB-2, *Molecular Biotechnology*, 33(2):93 pp.
- El-Sayed, S.T., Ali, A.M., El-Sayed, E.-S.M., Shousha, W.G., Omar, N.I.,** 2017, Characterization and potential antimicrobial effect of novel chitooligosaccharides against pathogenic microorganisms, *Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol*, 7(06):006-012 pp.
- El Kadib, A.,** 2016, Metal–Polysaccharide Interplay: Beyond Metal Immobilization, Graphenization-Induced-Anisotropic Growth, *ChemSusChem*, 9(3):238-240 pp.
- Elieh-Ali-Komi, D., Hamblin, M.R.,** 2016, Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials, *International journal of advanced research*, 4(3):411 pp.
- Eom, T.-K., Senevirathne, M., Kim, S.-K.,** 2012, Synthesis of phenolic acid conjugated chitooligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(2):519-527 pp.
- Fernandes, J.C., Tavaría, F.K., Fonseca, S.C., Ramos, Ó.S., Pintado, M.E., Malcata, F.X.,** 2010, In vitro screening for anti-microbial activity of chitosans and chitooligosaccharides, aiming at potential uses in functional textiles, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(2):311-318 pp.
- Fernandes, J.C., Tavaría, F.K., Soares, J.C., Ramos, Ó.S., Monteiro, M.J., Pintado, M.E., Malcata, F.X.,** 2008, Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems, *Food Microbiology*, 25(7):922-928 pp.
- Fernández-de Castro, L., Mengibar, M., Sánchez, Á., Arroyo, L., Villarán, M.C., de Apodaca, E.D., Heras, Á.,** 2016, Films of chitosan and chitosan-oligosaccharide neutralized and thermally treated: Effects on its antibacterial and other activities, *LWT-Food Science and Technology*, 73:368-374 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Fernandez, J.G., Ingber, D.E.,** 2014, Manufacturing of Large-Scale Functional Objects Using Biodegradable Chitosan Bioplastic, *Macromolecular Materials and Engineering*, 299(8):932-938 pp.
- Gao, X.-A., Ju, W.-T., Jung, W.-J., Park, R.-D.,** 2008, Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11, *Carbohydrate Polymers*, 72(3):513-520 pp.
- Ghazala, I., Haddar, A., Romdhane, M.B., Ellouz-Chaanouni, S.,** 2016, Screening and molecular identification of new microbial strains for production of enzymes of biotechnological interest, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59pp.
- Ghazala, I., Sayari, N., Romdhane, M.B., Ellouz-Chaabouni, S., Haddar, A.,** 2015, Assessment of pectinase production by *Bacillus mojavensis* I4 using an economical substrate and its potential application in oil sesame extraction, *Journal of food science and technology*, 52(12):7710-7722 pp.
- Gohi, B.F.C.A., Zeng, H.Y., Pan, A.D.,** 2016, Optimization and characterization of chitosan enzymolysis by Pepsin, *Bioengineering*, 3:17-31pp.
- Gomaa, E.Z.,** 2012, Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol, *The Journal of Microbiology*, 50(1):103-111 pp.
- Gómez-Ríos, D., Barrera-Zapata, R., Ríos-Estapa, R.,** 2017, Comparison of process technologies for chitosan production from shrimp shell waste: A techno-economic approach using Aspen Plus®, *Food and Bioproducts Processing*, 103:49-57 pp.
- Gurovic, M.V., Staffolo, M.D., Montero, M., Debbaudt, A., Albertengo, L., Rodríguez, M.,** 2015, Chitooligosaccharides as novel ingredients of fermented foods, *Food & function*, 6(11):3437-3443 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Haddar, A., Agrebi, R., Bougatef, A., Hmidet, N., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M.,** 2009, Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive, *Bioresource Technology*, 100(13):3366-3373 pp.
- Haddar, A., Etis, N., Nasri, M.,** 2012, Novel complex organic substrates for cultivation of bacteria like *Bacillus mojavensis* A21, *African Journal of Microbiology Research*, 6(47):7377-7382 pp.
- Haebel, S., Bahrke, S., Peter, M.G.,** 2007, Quantitative sequencing of complex mixtures of heterochitooligosaccharides by vMALDI-linear ion trap mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 79(15):5557-5566 pp.
- Hai, L., Diep, T.B., Nagasawa, N., Yoshii, F., Kume, T.,** 2003, Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 208:466-470 pp.
- Hamer, S.N., Cord-Landwehr, S., Biarnés, X., Planas, A., Waegeman, H., Moerschbacher, B.M., Kolkenbrock, S.,** 2015, Enzymatic production of defined chitosan oligomers with a specific pattern of acetylation using a combination of chitin oligosaccharide deacetylases, *Scientific Reports*, 5:8716 pp.
- Han, F.-S., Cui, B.-H., You, X.-F., Xing, Y.-F., Sun, X.-W.,** 2015, Anti-proliferation and radiosensitization effects of chitooligosaccharides on human lung cancer line HepG2, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(9):757-761 pp.
- Hattori, T., Anraku, N., Kato, R.,** 2010, Capillary electrophoresis of chitooligosaccharides in acidic solution: Simple determination using a quaternary-ammonium-modified column and indirect photometric detection with Crystal Violet, *Journal of Chromatography B*, 878(3):477-480 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Heggset, E.B., Dybvik, A.I., Hoell, I.A., Norberg, A.L., Sørli, M., Eijsink, V.G., Vårum, K.M.,** 2010, Degradation of chitosans with a family 46 chitosanase from *Streptomyces coelicolor* A3 (2), *Biomacromolecules*, 11(9):2487-2497 pp.
- Howling, G.I., Dettmar, P.W., Goddard, P.A., Hampson, F.C., Dornish, M., Wood, E.J.,** 2001, The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro, *Biomaterials*, 22(22):2959-2966 pp.
- Huang, J., Zhao, D., Hu, S., Mao, J., Mei, L.,** 2012, Biochemical activities of low molecular weight chitosans derived from squid pens, *Carbohydrate Polymers*, 87(3):2231-2236 pp.
- Huang, R., Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.-K.,** 2006, Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS), *Life Sciences*, 78(20):2399-2408 pp.
- Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K., Tanaka, N.,** 2008, Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1184(1):474-503 pp.
- Il'ina, A., Varlamov, V.,** 2015, In vitro antitumor activity of heterochitooligosaccharides (Review), *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(1):1-10 pp.
- Imoto, T., Yagishita, K.,** 1971, A simple activity measurement of lysozyme, *Agricultural and Biological Chemistry*, 35(7):1154-1156 pp.
- Jeon, Y.-J., Shahidi, F., Kim, S.-K.,** 2000, Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods, *Food Reviews International*, 16(2):159-176 pp.
- Jiang, M., Guo, Z., Wang, C., Yang, Y., Liang, X., Ding, F.,** 2014, Neural activity analysis of pure chito-oligomer components separated from a mixture of chitooligosaccharides, *Neuroscience Letters*, 581:32-36 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Jiang, Y., Fu, C., Wu, S., Liu, G., Guo, J., Su, Z.,** 2017, Determination of the deacetylation degree of chitooligosaccharides, *Marine Drugs*, 15(11):332 pp.
- Jo, Y.-Y., Jo, K.-J., Jin, Y.-L., Jung, W.-J., Kuk, J.-H., Kim, K.-Y., Kim, T.-H., Park, R.-D.,** 2003, Characterization of endochitosanases-producing *Bacillus cereus* P16, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(6):960-968 pp.
- Jung, W.-J., Park, R.-D.,** 2014, Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives, *Marine Drugs*, 12(11):5328-5356 pp.
- Kamil, Z., Saleh, M., Moustafa, S.,** 2007, Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol, *Global Journal of Molecular Sciences*, 2:57-66pp.
- Karagozlu, M.Z., Karadeniz, F., Kong, C.-S., Kim, S.-K.,** 2012, Aminoethylated chitooligomers and their apoptotic activity on AGS human cancer cells, *Carbohydrate Polymers*, 87(2):1383-1389 pp.
- Karagozlu, M.Z., Kim, J.-A., Karadeniz, F., Kong, C.-S., Kim, S.-K.,** 2010, Anti-proliferative effect of aminoderivatized chitooligosaccharides on AGS human gastric cancer cells, *Process Biochemistry*, 45(9):1523-1528 pp.
- Kerch, G.,** 2015, The potential of chitosan and its derivatives in prevention and treatment of age-related diseases, *Marine Drugs*, 13(4):2158-2182 pp.
- Kim, H.M., Hong, S.H., Yoo, S.J., Baek, K.S., Jeon, Y.J., Choung, S.Y.,** 2006, Differential effects of chitooligosaccharides on serum cytokine levels in aged subjects, *Journal of Medicinal Food*, 9(3):427-430 pp.
- Kim, J., Kim, J., Hong, J., Lee, S., Park, S., Lee, J.-H., Kim, J.,** 2013, LC-MS/MS analysis of chitooligosaccharides, *Carbohydrate Research*, 372:23-29 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kim, J.Y., Lee, J.K., Lee, T.S., Park, W.H.,** 2003, Synthesis of chitooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 32(1):23-27 pp.
- Kim, S.-K.** 2010. Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications, CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, 313p.
- Kim, S.-K., Rajapakse, N.,** 2005, Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review, *Carbohydrate Polymers*, 62(4):357-368 pp.
- Kobayashi, T., Koide, O., Deguchi, S., Horikoshi, K.,** 2011, Characterization of chitosanase of a deep biosphere *Bacillus* strain, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(4):669-673 pp.
- Kohlhoff, M., Niehues, A., Wattjes, J., Bénéteau, J., Cord-Landwehr, S., El Gueddari, N.E., Bernard, F., Rivera-Rodriguez, G.R., Moerschbacher, B.M.,** 2017, Chitinase: A fungal chitosan hydrolyzing enzyme with a new and unusually specific cleavage pattern, *Carbohydrate Polymers*, 174:1121-1128 pp.
- Kuk, J., Jung, W., Jo, G., Kim, Y., Kim, K., Park, R.,** 2005, Production of N-acetyl- β -D-glucosamine from chitin by *Aeromonas* sp. GJ-18 crude enzyme, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(3):384-389 pp.
- Kuk, J.H., Jung, W.J., Jo, G.H., Kim, K.Y., Park, R.D.,** 2006, Production of N, N'-diacetylchitobiose from chitin using temperature-sensitive chitinolytic enzyme preparations of *Aeromonas* sp. GJ-18, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(2):135-139 pp.
- Kumar, A.B.V., Varadaraj, M.C., Gowda, L.R., Tharanathan, R.N.,** 2005, Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*, *Biochemical Journal*, 391(2):167-175 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kurakake, M., Yo-u, S., Nakagawa, K., Sugihara, M., Komaki, T., 2000,** Properties of chitosanase from *Bacillus cereus* S1, *Current Microbiology*, 40(1):6-9 pp.
- Lan, X., Ozawa, N., Nishiwaki, N., Kodaira, R., Okazaki, M., Shimosaka, M., 2004,** Purification, cloning, and sequence analysis of β -N-acetylglucosaminidase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(5):1082-1090 pp.
- Laokuldilok, T., Potivas, T., Kanha, N., Surawang, S., Seesuriyachan, P., Wangtueai, S., Phimolsiripol, Y., Regensten, J.M., 2017,** Physicochemical, antioxidant, and antimicrobial properties of chitooligosaccharides produced using three different enzyme treatments, *Food Bioscience* pp.
- Le Dévédec, F., Bazinet, L., Furtos, A., Venne, K., Brunet, S., Mateescu, M.A., 2008,** Separation of chitosan oligomers by immobilized metal affinity chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1194(2):165-171 pp.
- Lee, B., Vasmataz, G., 1997,** Stabilization of protein structures, *Current Opinion in Biotechnology*, 8(4):423-428 pp.
- Lee, H.-W., Choi, J.-W., Han, D.-P., Park, M.-J., Lee, N.-W., Yi, D.-H., 1996a,** Purification and characteristics of chitosanase from *Bacillus* sp. HW-002, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6(1):19-25 pp.
- Lee, H.-W., Park, Y.-S., Jung, J.-S., Shin, W.-S., 2002,** Chitosan oligosaccharides, dp 2–8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp, *Anaerobe*, 8(6):319-324 pp.
- Lee, H.W., Jong, W.C., Dong, P.H., Noo, W.L., Sung, L.P., Dong, H.Y., 1996b,** Identification and production of constitutive chitosanase from *Bacillus* sp. HW-002, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6(1):12-18 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Lee, S.-H., Senevirathne, M., Ahn, C.-B., Kim, S.-K., Je, J.-Y., 2009, Factors affecting anti-inflammatory effect of chitooligosaccharides in lipopolysaccharides-induced RAW264. 7 macrophage cells, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(23):6655-6658 pp.
- Li, K., Liu, S., Xing, R., Qin, Y., Li, P., 2013, Preparation, characterization and antioxidant activity of two partially N-acetylated chitotrioses, *Carbohydrate Polymers*, 92(2):1730-1736 pp.
- Li, K., Xing, R., Liu, S., Li, R., Qin, Y., Meng, X., Li, P., 2012, Separation of chito-oligomers with several degrees of polymerization and study of their antioxidant activity, *Carbohydrate Polymers*, 88(3):896-903 pp.
- Li, Y., Liu, H., Xu, Q.-S., Du, Y.-G., Xu, J., 2014, Chitosan oligosaccharides block LPS-induced O-GlcNAcylation of NF- κ B and endothelial inflammatory response, *Carbohydrate Polymers*, 99:568-578 pp.
- Liang, T.-W., Chen, W.-T., Lin, Z.-H., Kuo, Y.-H., Nguyen, A.D., Pan, P.-S., Wang, S.-L., 2016, An amphiprotic novel chitosanase from *Bacillus mycoides* and its application in the production of chitooligomers with their antioxidant and anti-inflammatory evaluation, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8):1302 pp.
- Liang, T.-W., Chen, Y.-Y., Pan, P.-S., Wang, S.-L., 2014a, Purification of chitinase/chitosanase from *Bacillus cereus* and discovery of an enzyme inhibitor, *International Journal of Biological Macromolecules*, 63:8-14 pp.
- Liang, T.-W., Hsieh, J.-L., Wang, S.-L., 2012, Production and purification of a protease, a chitosanase, and chitin oligosaccharides by *Bacillus cereus* TKU022 fermentation, *Carbohydrate Research*, 362:38-46 pp.
- Liang, T.-W., Hsieh, T.-Y., Wang, S.-L., 2014b, Purification of a thermostable chitinase from *Bacillus cereus* by chitin affinity and its application in microbial community changes in soil, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(6):1201-1209 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Liang, T.-W., Lo, B.-C., Wang, S.-L.,** 2015, Chitinolytic bacteria-assisted conversion of squid pen and its effect on dyes and pigments adsorption, *Marine Drugs*, 13(8):4576-4593 pp.
- Liaqat, F., Eltem, R.,** 2018, Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review, *Carbohydrate Polymers*, 184: 243-259 pp.
- Lin, Y.-W., Hsiao, Y.-C., Chiang, B.-H.,** 2009, Production of high degree polymerized chitooligosaccharides in a membrane reactor using purified chitosanase from *Bacillus cereus*, *Food Research International*, 42(9):1355-1361 pp.
- Liu, H.-T., Li, W.-M., Xu, G., Li, X.-Y., Bai, X.-F., Wei, P., Yu, C., Du, Y.-G.,** 2009, Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells, *Pharmacological Research*, 59(3):167-175 pp.
- Liu, P., Piao, X., Kim, S., Wang, L., Shen, Y., Lee, H., Li, S.,** 2008, Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of and in weaning pigs, *Journal of Animal Science*, 86(10):2609-2618 pp.
- Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., Fan, F., Wang, J., Jin, C., Chang, J.,** 2012, Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor, *Science*, 336(6085):1160-1164 pp.
- Lodhi, G., Kim, Y.-S., Hwang, J.-W., Kim, S.-K., Jeon, Y.-J., Je, J.-Y., Ahn, C.-B., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., Park, P.-J.,** 2014, Chitooligosaccharide and its derivatives: preparation and biological applications, *BioMed research international*, 2014pp.
- Logesh, A., Thillaimaharani, K., Sharmila, K., Kalaiselvam, M., Raffi, S.,** 2012, Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity, *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(2):140-143 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Lopatin, S., Derbeneva, M., Kulikov, S., Varlamov, V., Shpigun, O.,** 2009, Fractionation of chitosan by ultrafiltration, *Journal of Analytical Chemistry*, 64(6):648-651 pp.
- Lu, X., Guo, H., Zhang, Y.,** 2012, Protective effects of sulfated chitooligosaccharides against hydrogen peroxide-induced damage in MIN6 cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(1):50-58 pp.
- Luo, C., Liu, W., Luo, B., Tian, J., Wen, W., Liu, M., Zhou, C.,** 2017, Antibacterial activity and cytocompatibility of chitooligosaccharide-modified polyurethane membrane via polydopamine adhesive layer, *Carbohydrate Polymers*, 156:235-243 pp.
- Luo, Y., Deng, L., Deng, Q.-J., Wen, L.,** 2016, Comparative study of the chitooligosaccharides effect on the proliferation inhibition and radiosensitization of three types of human gastric cancer cell line, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(6):601-605 pp.
- Luo, Z., Dong, X., Ke, Q., Duan, Q., Shen, L.,** 2014, Chitooligosaccharides inhibit ethanol-induced oxidative stress via activation of Nrf2 and reduction of MAPK phosphorylation, *Oncology Reports*, 32(5):2215-2222 pp.
- Mahata, M., Shinya, S., Masaki, E., Yamamoto, T., Ohnuma, T., Brzezinski, R., Mazumder, T.K., Yamashita, K., Narihiro, K., Fukamizo, T.,** 2014, Production of chitooligosaccharides from *Rhizopus oligosporus* NRRL2710 cells by chitosanase digestion, *Carbohydrate Research*, 383:27-33 pp.
- Mateos-Aparicio, I., Mengíbar, M., Heras, A.,** 2016, Effect of chitooligosaccharides over human faecal microbiota during fermentation in batch cultures, *Carbohydrate Polymers*, 137:617-624 pp.
- McDowell, J.M., Dangl, J.L.,** 2000, Signal transduction in the plant immune response, *Trends in Biochemical Sciences*, 25(2):79-82 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Mei, Y.-x., Chen, H.-x., Zhang, J., Zhang, X.-d., Liang, Y.-x.,** 2013, Protective effect of chitooligosaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice, *International Journal of Biological Macromolecules*, 62:330-335 pp.
- Mei, Y.-x., Dai, X.-y., Yang, W., Xu, X.-w., Liang, Y.-x.,** 2015, Antifungal activity of chitooligosaccharides against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 77:330-335 pp.
- Mekasha, S., Byman, I.R., Lynch, C., Toupalová, H., Anděra, L., Næs, T., Vaaje-Kolstad, G., Eijsink, V.G.,** 2017, Development of enzyme cocktails for complete saccharification of chitin using mono-component enzymes from *Serratia marcescens*, *Process Biochemistry*, 56:132-138 pp.
- Mengibar, M., Mateos-Aparicio, I., Miralles, B., Heras, Á.,** 2013, Influence of the physico-chemical characteristics of chito-oligosaccharides (COS) on antioxidant activity, *Carbohydrate Polymers*, 97(2):776-782 pp.
- Miller, G.,** 1959, Use of DNS reagent for the measurement of reducing sugar, *Anal. Chem*, 31(1):426-428 pp.
- Minagawa, T., Okamura, Y., Shigemasa, Y., Minami, S., Okamoto, Y.,** 2007, Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing, *Carbohydrate Polymers*, 67(4):640-644 pp.
- Moon, J.-S., Kim, H.-K., Koo, H.C., Joo, Y.-S., Nam, H.-m., Park, Y.H., Kang, M.-I.,** 2007, The antibacterial and immunostimulative effect of chitosan-oligosaccharides against infection by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5):989-998 pp.
- Mourya, V., Inamdar, N., Choudhari, Y.M.,** 2011, Chitooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications, *Polymer Science Series A*, 53(7):583-612 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Muslim, S.N., AL-Kadmy, I.M., Hussein, N.H., Ali, A.N.M., Taha, B.M., Aziz, S.N., Al Kheraif, A.A., Divakar, D.D., Ramakrishnaiah, R.,** 2016, Chitosanase purified from bacterial isolate *Bacillus licheniformis* of ruined vegetables displays broad spectrum biofilm inhibition, *Microbial Pathogenesis*, 100:257-262 pp.
- Mustafa, S.R., Husaini, A., Hipolito, C.N., Hussain, H., Suhaili, N., Roslan, H.A.,** 2016, Application of Response Surface Methodology for optimizing process parameters in the production of amylase by *Aspergillus flavus* NSH9 under Solid State Fermentation, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59pp.
- Muzzarelli, R.A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., DeMarchis, M., Paoletti, M.G.,** 2012, Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial, *Carbohydrate Polymers*, 87(2):995-1012 pp.
- Nampally, M., Rajulu, M., Gillet, D., Suryanarayanan, T., Moerschbacher, B.B.,** 2015, A high diversity in chitinolytic and chitosanolytic species and enzymes and their oligomeric products exist in soil with a history of chitin and chitosan exposure, *BioMed research international*, 2015pp.
- Ngo, D.-H., Qian, Z.-J., Ngo, D.-N., Vo, T.-S., Wijesekara, I., Kim, S.-K.,** 2011, Gallyl chitooligosaccharides inhibit intracellular free radical-mediated oxidation, *Food Chemistry*, 128(4):974-981 pp.
- Ngo, D.-H., Vo, T.-S., Ngo, D.-N., Kang, K.-H., Je, J.-Y., Pham, H.N.-D., Byun, H.-G., Kim, S.-K.,** 2015, Biological effects of chitosan and its derivatives, *Food Hydrocolloids*, 51:200-216 pp.
- Ngo, D.-N., Kim, M.-M., Kim, S.-K.,** 2008, Chitin oligosaccharides inhibit oxidative stress in live cells, *Carbohydrate Polymers*, 74(2):228-234 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ngo, D.-N., Lee, S.-H., Kim, M.-M., Kim, S.-K.,** 2009, Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells, *Journal of Functional Foods*, 1(2):188-198 pp.
- Nidheesh, T., Kumar, P.G., Suresh, P.,** 2015, Enzymatic degradation of chitosan and production of d-glucosamine by solid substrate fermentation of exo- β -d-glucosaminidase (exochitosanase) by *Penicillium decumbens* CFRNT15, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 97:97-106 pp.
- Nurhayati, Y., Manaf, A.A., Osman, H., Abdullah, A.B.C., Tang, J.Y.H.,** 2016, Effect of chitosan oligosaccharides on the growth of *Bifidobacterium* Species, *Malaysian Journal of Applied Sciences*, 1(1):13-23 pp.
- Nwe, N., Furuike, T., Tamura, H.,** 2009, The mechanical and biological properties of chitosan scaffolds for tissue regeneration templates are significantly enhanced by chitosan from *Gongronella butleri*, *Materials*, 2(2):374-398 pp.
- Oh, C., De Zoysa, M., Kang, D.-H., Lee, Y., Whang, I., Nikapitiya, C., Heo, S.-J., Yoon, K.-T., Affan, A., Lee, J.,** 2011, Isolation, purification, and enzymatic characterization of extracellular chitosanase from marine bacterium *Bacillus subtilis* CH2, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(10):1021-1025 pp.
- Okamoto, Y., Yano, R., Miyatake, K., Tomohiro, I., Shigemasa, Y., Minami, S.,** 2003, Effects of chitin and chitosan on blood coagulation, *Carbohydrate Polymers*, 53(3):337-342 pp.
- Olicón-Hernández, D.R., Vázquez-Landaverde, P.A., Cruz-Camarillo, R., Rojas-Avelizapa, L.I.,** 2017, Comparison of chito-oligosaccharide production from three different colloidal chitosans using the endochitonsanolytic system of *Bacillus thuringiensis*, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(2):116-122 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Oliveira, E., El Gueddari, N.E., Moerschbacher, B.M., Peter, M.G., Franco, T.T.,** 2008, Growth of phytopathogenic fungi in the presence of partially acetylated chitooligosaccharides, *Mycopathologia*, 166(3):163-174 pp.
- Pagnoncelli, M.G.B., Araújo, N.K.d., Silva, N.M.P.d., Assis, C.F.d., Rodrigues, S., Macedo, G.R.d.,** 2010, Chitosanase production by *Paenibacillus ehimensis* and its application for chitosan hydrolysis, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(6):1461-1468 pp.
- Park, B.K., Kim, M.-M.,** 2010, Applications of chitin and its derivatives in biological medicine, *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12):5152-5164 pp.
- Park, J.K., Chung, M.J., Choi, H.N., Park, Y.I.,** 2011, Effects of the molecular weight and the degree of deacetylation of chitosan oligosaccharides on antitumor activity, *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1):266-277 pp.
- Park, J.K., Shimono, K., Ochiai, N., Shigeru, K., Kurita, M., Ohta, Y., Tanaka, K., Matsuda, H., Kawamukai, M.,** 1999, Purification, characterization, and gene analysis of a chitosanase (ChoA) from *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001, *Journal of Bacteriology*, 181(21):6642-6649 pp.
- Park, P.-J., Je, J.-Y., Kim, S.-K.,** 2004, Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer, *Carbohydrate Polymers*, 55(1):17-22 pp.
- Popa-Nita, S., Lucas, J.-M., Ladaviere, C., David, L., Domard, A.,** 2009, Mechanisms involved during the ultrasonically induced depolymerization of chitosan: characterization and control, *Biomacromolecules*, 10(5):1203-1211 pp.
- Prakash, N., Gopal, S.,** 2017, Characterization of an extracellular chitosanase from the soil bacterium *Bacillus cereus* CH12, *IIOAB Journal*, 8(1):1-6 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Prashanth, K.H., Tharanathan, R.,** 2007, Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview, *Trends in Food Science & Technology*, 18(3):117-131 pp.
- Prashanth, K.H., Tharanathan, R.,** 2005, Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1722(1):22-29 pp.
- Qiao, Y., Bai, X.-F., Du, Y.-G.,** 2011, Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress, *International Immunopharmacology*, 11(1):121-127 pp.
- Qin, C., Du, Y., Xiao, L., Li, Z., Gao, X.,** 2002, Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 31(1):111-117 pp.
- Qu, D., Han, J.,** 2016, Investigation of the antioxidant activity of chitoooligosaccharides on mice with high-fat diet, *Revista Brasileira de Zootecnia*, 45(11):661-666 pp.
- Quintero-Villegas, M.I., Aam, B.B., Rupnow, J., Sørlie, M., Eijsink, V.G., Hutkins, R.W.,** 2013, Adherence inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by chitoooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(11):2748-2754 pp.
- Rahman, M.H., Hjeljord, L.G., Aam, B.B., Sørlie, M., Tronsmo, A.,** 2015, Antifungal effect of chito-oligosaccharides with different degrees of polymerization, *European Journal of Plant Pathology*, 141(1):147-158 pp.
- Rajapakse, N., Kim, M.-M., Mendis, E., Kim, S.-K.,** 2007, Inhibition of free radical-mediated oxidation of cellular biomolecules by carboxylated chitoooligosaccharides, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(2):997-1003 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Raji, R., Nampoothiri, K., Szakacs, G., Nagy, V., Pandey, A.,** 2009, Statistical optimization of L-leucine amino peptidase production from *Streptomyces gedanensis* IFO 13427 under submerged fermentation using response surface methodology, pp.
- Rao, M., Chander, R., Sharma, A.,** 2008, Synergistic effect of chitooligosaccharides and lysozyme for meat preservation, *LWT-Food Science and Technology*, 41(10):1995-2001 pp.
- Riordan, J.F.,** 1977, The role of metals in enzyme activity, *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 7(2):119-129 pp.
- Rokhati, N., Susanto, H., Haryani, K., Pramudono, B.,** 2017, Enhanced enzymatic hydrolysis of chitosan by surfactant addition, *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 1-6pp.
- Ryu, B., Kim, S.-Y., Vo, T.-S., Kim, W.-S., Kim, D.G., Kim, S.-K.,** 2017, Characterization of the in vitro effects of gallic acid-grafted-chitooligosaccharides in the suppression of AGS human gastric cancer cell proliferation, *RSC Advances*, 7(39):24561-24568 pp.
- Sánchez, Á., Mengibar, M., Rivera-Rodríguez, G., Moerchbacher, B., Acosta, N., Heras, A.,** 2017, The effect of preparation processes on the physicochemical characteristics and antibacterial activity of chitooligosaccharides, *Carbohydrate Polymers*, 157:251-257 pp.
- Santos-Moriano, P., Fernandez-Arrojo, L., Mengibar, M., Belmonte-Reche, E., Peñalver, P., Acosta, F., Ballesteros, A., Morales, J., Kidibule, P., Fernandez-Lobato, M.,** 2017, Enzymatic production of fully deacetylated chitooligosaccharides and their neuroprotective and anti-inflammatory properties, *Biocatalysis and Biotransformation*:1-11 pp.
- Santos-Moriano, P., Woodley, J.M., Plou, F.J.,** 2016, Continuous production of chitooligosaccharides by an immobilized enzyme in a dual-reactor system, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133:211-217 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E., Sukwattanasinitt, M., Pichyangkura, R., Aiba, S.-i.,** 2003, Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin. Degradation study of N-acetylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes, *Carbohydrate Polymers*, 51(4):391-395 pp.
- Senevirathne, M., Ahn, C.-B., Je, J.-Y.,** 2011, Hepatoprotective effect of chitooligosaccharides against tert-butylhydroperoxide-induced damage in Chang liver cells, *Carbohydrate Polymers*, 83(2):995-1000 pp.
- Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N., Kotan, R.,** 2014, Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13(1):35 pp.
- Shariatikia, M., Behbahani, M., Mohabatkar, H.,** 2017, Anticancer activity of cow, sheep, goat, mare, donkey and camel milks and their caseins and whey proteins and in silico comparison of the caseins, *Molecular Biology Research Communications*:57-64 pp.
- Shen, K.-T., Chen, M.-H., Chan, H.-Y., Jeng, J.-H., Wang, Y.-J.,** 2009, Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis, *Food and Chemical Toxicology*, 47(8):1864-1871 pp.
- Shinya, S., Fukamizo, T.,** 2017, Interaction between chitosan and its related enzymes: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*pp.
- Shivakumar, S., Karmali, A.N., Ruhimbana, C.,** 2014, Partial purification, characterization, and kinetic studies of a low-molecular-weight, alkali-tolerant chitinase enzyme from *Bacillus subtilis* JN032305, a potential biocontrol strain, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44(6):617-632 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Sinha, S., Chand, S., Tripathi, P.,** 2016, Recent progress in chitosanase production of monomer-Free chitoooligosaccharides: Bioprocess strategies and Future Applications, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(5):883-899 pp.
- Sinha, S., Tripathi, P., Chand, S.,** 2012, A new bifunctional chitosanase enzyme from *Streptomyces* sp. and its application in production of antioxidant chitoooligosaccharides, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5):1029-1039 pp.
- Slimene, I.B., Tabbene, O., Gharbi, D., Mnasri, B., Schmitter, J.M., Urdaci, M.-C., Limam, F.,** 2015, Isolation of a chitinolytic *Bacillus licheniformis* S213 strain exerting a biological control against *Phoma medicaginis* infection, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(7):3494-3506 pp.
- Sørbotten, A., Horn, S.J., Eijsink, V.G., Vårum, K.M.,** 2005, Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*, *FEBS Journal*, 272(2):538-549 pp.
- Su, C., Wang, D., Yao, L., Yu, Z.,** 2006a, Purification, characterization, and gene cloning of a chitosanase from *Bacillus* species strain S65, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12):4208-4214 pp.
- Su, C., Zhou, W., Fan, Y., Wang, L., Zhao, S., Yu, Z.,** 2006b, Mutation breeding of chitosanase-producing strain *Bacillus* sp. S65 by low-energy ion implantation, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(12):1037-1042 pp.
- Sun, Y., Han, B., Liu, W., Zhang, J., Gao, X.,** 2007, Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium* sp. OU01, *Bioresource Technology*, 98(8):1548-1553 pp.
- Swiatkiewicz, S., Swiatkiewicz, M., Arczewska-Wlosek, A., Jozefiak, D.,** 2015, Chitosan and its oligosaccharide derivatives (chito-oligosaccharides) as feed supplements in poultry and swine nutrition, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(1):1-12 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Tanaka, T., Fukui, T., Atomi, H., Imanaka, T.,** 2003, Characterization of an exo- β -D-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, *Journal of Bacteriology*, 185(17):5175-5181 pp.
- Thadathil, N., Kuttappan, A.K.P., Vallabaipatel, E., Kandasamy, M., Velappan, S.P.,** 2014, Statistical optimization of solid state fermentation conditions for the enhanced production of thermoactive chitinases by mesophilic soil fungi using response surface methodology and their application in the reclamation of shrimp processing by-products, *Annals of microbiology*, 64(2):671-681 pp.
- Thadathil, N., Velappan, S.P.,** 2014, Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review, *Food Chemistry*, 150:392-399 pp.
- Thamthiankul, S., Suan-Ngay, S., Tantimavanich, S., Panbangred, W.,** 2001, Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. pakistani, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3-4):395-401 pp.
- Thein-Han, W., Kitiyanant, Y., Misra, R.,** 2008, Chitosan as scaffold matrix for tissue engineering, *Materials Science and Technology*, 24(9):1062-1075 pp.
- Tomida, H., Fujii, T., Furutani, N., Michihara, A., Yasufuku, T., Akasaki, K., Maruyama, T., Otagiri, M., Gebicki, J.M., Anraku, M.,** 2009, Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans, *Carbohydrate Research*, 344(13):1690-1696 pp.
- Trinh, M.D.L., Dinh, M.-H., Ngo, D.-H., Tran, D.-K., Tran, Q.-T., Vo, T.-S., Ngo, D.-N.,** 2014, Protection of 4-hydroxybenzyl-chitoooligomers against inflammatory responses in Chang liver cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, 66:1-6 pp.
- Trombotto, S., Ladavière, C., Delolme, F., Domard, A.,** 2008, Chemical preparation and structural characterization of a homogeneous series of chitin/chitosan oligomers, *Biomacromolecules*, 9(7):1731-1738 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Uragami, T., Tokura, S.** 2006. Material science of chitin and chitosan, Kodansha Scientific Ltd., Tokyo, 293–300p.
- Van Ta, Q., Kim, M.-M., Kim, S.-K.,** 2006, Inhibitory effect of chitooligosaccharides on matrix metalloproteinase-9 in human fibrosarcoma cells (HT1080), *Marine Biotechnology*, 8(6):593-599 pp.
- Venkatesan, J., Pangestuti, R., Qian, Z.-J., Ryu, B., Kim, S.-K.,** 2010, Biocompatibility and alkaline phosphatase activity of phosphorylated chitooligosaccharides on the osteosarcoma MG63 cell line, *Journal of functional biomaterials*, 1(1):3-13 pp.
- Vieille, C., Zeikus, J.G.,** 1996, Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability, *Trends in Biotechnology*, 14(6):183-190 pp.
- Villa-Lerma, G., González-Márquez, H., Gimeno, M., López-Luna, A., Bárzana, E., Shirai, K.,** 2013, Ultrasonication and steam-explosion as chitin pretreatments for chitin oligosaccharide production by chitinases of *Lecanicillium lecanii*, *Bioresource Technology*, 146:794-798 pp.
- Vo, T.-S., Kong, C.-S., Kim, S.-K.,** 2011, Inhibitory effects of chitooligosaccharides on degranulation and cytokine generation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells, *Carbohydrate Polymers*, 84(1):649-655 pp.
- Vo, T.-S., Ngo, D.-H., Bach, L.G., Ngo, D.-N., Kim, S.-K.,** 2017, The free radical scavenging and anti-inflammatory activities of gallate-chitooligosaccharides in human lung epithelial A549 cells, *Process Biochemistry*.
- Vo, T.-S., Ngo, D.-H., Van Ta, Q., Wijesekara, I., Kong, C.-S., Kim, S.-K.,** 2012, Protective effect of chitin oligosaccharides against lipopolysaccharide-induced inflammatory response in BV-2 microglia, *Cellular Immunology*, 277(1):14-21 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Wang, J., Zhang, J., Song, F., Gui, T., Xiang, J.,** 2015, Purification and characterization of chitinases from ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*, *Molecules*, 20(2):1955-1967 pp.
- Wang, S.-L., Chen, S.-J., Wang, C.-L.,** 2008a, Purification and characterization of chitinases and chitosanases from a new species strain *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as a substrate, *Carbohydrate Research*, 343(7):1171-1179 pp.
- Wang, S.-L., Chen, T.-R., Liang, T.-W., Wu, P.-C.,** 2009, Conversion and degradation of shellfish wastes by *Bacillus cereus* TKU018 fermentation for the production of chitosanases and bioactive materials, *Biochemical Engineering Journal*, 48(1):111-117 pp.
- Wang, S.-L., Lin, H.-T., Liang, T.-W., Chen, Y.-J., Yen, Y.-H., Guo, S.-P.,** 2008b, Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials, *Bioresource Technology*, 99(10):4386-4393 pp.
- Wang, S.-L., Liu, C.-P., Liang, T.-W.,** 2012, Fermented and enzymatic production of chitin/chitosan oligosaccharides by extracellular chitinases from *Bacillus cereus* TKU027, *Carbohydrate Polymers*, 90(3):1305-1313 pp.
- Wang, Z., Zheng, L., Yang, S., Niu, R., Chu, E., Lin, X.,** 2007, N-acetylchitooligosaccharide is a potent angiogenic inhibitor both in vivo and in vitro, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(1):26-31 pp.
- Wee, Y.J., Reddy, L., Chung, K.C., Ryu, H.W.,** 2009, Optimization of chitosanase production from *Bacillus* sp. RKY3 using statistical experimental designs, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(9):1356-1363 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Wei, X., Wang, Y., Zhu, Q., Xiao, J., Xia, W.,** 2009, Effects of chitosan pentamer and chitosan hexamer in vivo and in vitro on gene expression and secretion of cytokines, *Food and Agricultural Immunology*, 20(3):269-280 pp.
- Weikert, T., Niehues, A., Cord-Landwehr, S., Hellmann, M.J., Moerschbacher, B.M.,** 2017, Reassessment of chitosanase substrate specificities and classification, *Nature communications*, 8(1):1698 pp.
- Woo, C.-J., Park, H.-D.,** 2003, An extracellular *Bacillus* sp. chitinase for the production of chitotriose as a major chitinolytic product, *Biotechnology Letters*, 25(5):409-412 pp.
- Wu, G.J., Tsai, G.J.,** 2007, Chitooligosaccharides in combination with interferon- γ increase nitric oxide production via nuclear factor- κ B activation in murine RAW264. 7 macrophages, *Food and Chemical Toxicology*, 45(2):250-258 pp.
- Wu, H., Aam, B.B., Wang, W., Norberg, A.L., Sørli, M., Eijsink, V.G., Du, Y.,** 2012, Inhibition of angiogenesis by chitooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization, *Carbohydrate Polymers*, 89(2):511-518 pp.
- Wu, H., Yao, Z., Bai, X., Du, Y., Ma, X.,** 2010, Chitooligosaccharides inhibit nitric oxide mediated migration of endothelial cells in vitro and tumor angiogenesis in vivo, *Carbohydrate Polymers*, 82(3):927-932 pp.
- Wu, N., Wen, Z.-S., Xiang, X.-W., Huang, Y.-N., Gao, Y., Qu, Y.-L.,** 2015, Immunostimulative activity of low molecular weight chitosans in RAW264. 7 macrophages, *Marine Drugs*, 13(10):6210-6225 pp.
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., Chen, J.,** 2011, Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides, *Food Hydrocolloids*, 25(2):170-179 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Xia, Z., Wu, S., Chen, J.,** 2013, Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis using hydrogen peroxide, *International Journal of Biological Macromolecules*, 59:242-245 pp.
- Xing, R., Liu, Y., Li, K., Yu, H., Liu, S., Yang, Y., Chen, X., Li, P.,** 2017, Monomer composition of chitooligosaccharides obtained by different degradation methods and their effects on immunomodulatory activities, *Carbohydrate Polymers*, 157:1288-1297 pp.
- Xiong, C., Wu, H., Wei, P., Pan, M., Tuo, Y., Kusakabe, I., Du, Y.,** 2009, Potent angiogenic inhibition effects of deacetylated chitohexaose separated from chitooligosaccharides and its mechanism of action in vitro, *Carbohydrate Research*, 344(15):1975-1983 pp.
- Xu, Q., Liu, M., Liu, Q., Wang, W., Du, Y., Yin, H.,** 2017, The inhibition of LPS-induced inflammation in RAW264. 7 macrophages via the PI3K/Akt pathway by highly N-acetylated chitooligosaccharide, *Carbohydrate Polymers*, 174:1138-1143 pp.
- Xu, Q., Ma, P., Yu, W., Tan, C., Liu, H., Xiong, C., Qiao, Y., Du, Y.,** 2010, Chitooligosaccharides protect human embryonic hepatocytes against oxidative stress induced by hydrogen peroxide, *Marine Biotechnology*, 12(3):292-298 pp.
- Xu, W., Jiang, C., Kong, X., Liang, Y., Rong, M., Liu, W.,** 2012, Chitooligosaccharides and N-acetyl-D-glucosamine stimulate peripheral blood mononuclear cell-mediated antitumor immune responses, *Molecular Medicine Reports*, 6(2):385-390 pp.
- Yang, F., Luan, B., Sun, Z., Yang, C., Yu, Z., Li, X.,** 2016, Application of chitooligosaccharides as antioxidants in beer to improve the flavour stability by protecting against beer staling during storage, *Biotechnology Letters*:1-6 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Yoon, H.-G., Kim, H.-Y., Lim, Y.-H., Kim, H.-K., Shin, D.-H., Hong, B.-S., Cho, H.-Y.,** 2000, Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. strain CK4: cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9):3727-3734 pp.
- Yoon, H.G., Ha, S.C., Lim, Y.H., Cho, H.Y.,** 1998, New thermostable Chitosanase from *Bacillus* sp, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(5):449-454 pp.
- Yousef, M., Pichyangkura, R., Soodvilai, S., Chatsudthipong, V., Muanprasat, C.,** 2012, Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease: therapeutic efficacy and possible mechanisms of action, *Pharmacological Research*, 66(1):66-79 pp.
- Zhang, H., Sang, Q., Zhang, W.,** 2012a, Statistical optimization of chitosanase production by *Aspergillus* sp. QD-2 in submerged fermentation, *Annals of microbiology*, 62(1):193-201 pp.
- Zhang, H., Zhang, W.,** 2013, Induction and optimization of chitosanase production by *Aspergillus fumigatus* YT-1 using response surface methodology, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 27(3):335-345 pp.
- Zhang, J., Cao, H., Li, S., Zhao, Y., Wang, W., Xu, Q., Du, Y., Yin, H.,** 2015, Characterization of a new family 75 chitosanase from *Aspergillus* sp. W-2, *International Journal of Biological Macromolecules*, 81:362-369 pp.
- Zhang, J., Zhang, W., Mamadouba, B., Xia, W.,** 2012b, A comparative study on hypolipidemic activities of high and low molecular weight chitosan in rats, *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(4):504-508 pp.
- Zhang, P., Liu, W., Peng, Y., Han, B., Yang, Y.,** 2014, Toll like receptor 4 (TLR4) mediates the stimulating activities of chitosan oligosaccharide on macrophages, *International Immunopharmacology*, 23(1):254-261 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Zhao, D., Wang, J., Tan, L., Sun, C., Dong, J.,** 2013, Synthesis of N-furoyl chitosan and chito-oligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity in vitro, *International Journal of Biological Macromolecules*, 59:391-395 pp.
- Zheng, B., Wen, Z.-S., Huang, Y.-J., Xia, M.-S., Xiang, X.-W., Qu, Y.-L.,** 2016, Molecular weight-dependent immunostimulative activity of low molecular weight chitosan via regulating NF- κ B and AP-1 signaling pathways in RAW264. 7 Macrophages, *Marine Drugs*, 14(9):169 pp.
- Zou, P., Li, K., Liu, S., Xing, R., Qin, Y., Yu, H., Zhou, M., Li, P.,** 2015, Effect of chitooligosaccharides with different degrees of acetylation on wheat seedlings under salt stress, *Carbohydrate Polymers*, 126:62-69 pp.

ÖZGEÇMİŞ

GENEL BİLGİLER			
Düzenleme Tarihi: 2018			
Kimlik No: 35102-9300311-2			
Adı Soyadı: Fakhra LIAQAT			
Yazışma Adresi: 81 Nargis Block Allama Iqbal Town Lahore, Pakistan			
Doğum Tarihi: 24.03.1989			
Doğum Yeri: Lahore/PAKISTAN			
Tel: +92335-0482998			
E-posta: fakhra243@gmail.com			
Medeni Durumu: Bekâr			
EĞİTİM			
Öğrenim Dönemi	Derece	Üniversite	Öğrenim Alanı
2011-2013	Yüksek Lisans	University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore	Mikrobiyoloji
2007-2011	Lisans	University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore	Mikrobiyoloji
YAYIN BİLGİLERİ			
1. Liaqat F., Sheikh AA., Nazir J., Hussain T., Rabbani M., Shaheen AY., Muhammad J, 2015, Isolation identification and control of vancomycin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>. <i>Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences</i> 28(3):997-1004pp. 2. Muhammad J., Anjum AA., Rabbani M., Muhammad K., Wasim M., Ahmad A., Sheikh AA., Khalid RK., Shaheen AY., Liaqat F, 2015, <i>In vitro</i> efficacy of garlic, glycyrrhiza and neem against local isolates of <i>mycoplasma gallisepticum</i>. <i>The Journal of Animal & Plant Sciences</i>, 25(1): 295-297pp. 3. Shaheen AF., Sheikh AA., Rabbani M., Aslam A., Bibi T., Liaqat F., Muhammad J., Rehmani SF, 2015, Antibacterial activity of herbal extracts against multi-drug resistant <i>Escherichia coli</i> recovered from retail chicken meat. <i>Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences</i> 28(4):1295-1300pp. 4. Rasool A., Akhtar S., Muhammad K., Rabbani M., Anjum AA., Muhammad J., Ahmad A., Sheikh AA., Liaqat F., Akhtar F., Tahir R, 2016, Comparative evaluation of factors affecting hemagglutinating activity of avian influenza (H9) virus. <i>Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences</i>, 40:102-106pp.			

5. **Liaqat F.**, Eltem R, 2016, Identification and characterization of endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures of peach and pear rootstocks. *3 Biotech*, 2016 (6):120–127pp.
6. Kolsal F., Akbal Z., **Liaqat F.**, Gök O., Sponza DT., and Eltem R, 2017, Hydrocarbon degradation abilities of psychrotolerant *Bacillus* strains. *AIMS Microbiology*, 3(3): 467-482pp.
7. Sözer-Bahadır, P., **Liaqat, F.**, Eltem, R. 2018, Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from Aegean region of Turkey, *Turkish Journal of Botany* 2018(42).
8. **Liaqat F.**, Eltem R, 2018, Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. *Carbohydrate Polymers*, 184:243–259pp.
9. **Liaqat, F.**, Sözer-Bahadır P., Elibol, M., Eltem, R. Optimization of chitosanase production by *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i, *Journal of Basic Microbiology* (Değerlendirmede).

POSTER VE SÖZLÜ BİLDİRİLERİ

- Sözer S., Sargın S., **Liaqat F.**, Eltem R. (2017). Micropropagule production from *Trichoderma citrinoviride* using solid state fermentation. 1th International Eurasia Mycology Congress, 03-05 July 2017, Manisa, Turkey. **(Sözlü Bildiri)**
- **Liaqat F.**, Eltem, R. (2017). Plant growth promoting properties of endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures of peach and pear rootstocks, VI. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 22-25 December 2017, Afyon, Turkey. **(Sözlü Bildiri)**
- **Liaqat F.**, Eltem, R. (2017). Optimization of chitosanase production by *Bacillus thuringiensis*. VI. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 22-25 December 2017, Afyon, Turkey. **(Poster Bildiri)**
- Sözer-Bahadır P., **Liaqat F.**, Eltem R. (2017). Phosphate solubilizing *Bacillus* species as potential biofertilizers. VI. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 22-25 December 2017, Afyon, Turkey. **(Sözlü Bildiri)**

PROJE DENEYİMİ

TAMAMLANAN BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ (BAP) (2)

- Kitinolitik *Bacillus* suşları kullanılarak kitooligosakkaritlerin enzimatik üretimi (2015). (E.Ü. Bilimsel Araştırma Projeler Birimi; Araştırmacı) Proje Yürütücüsü: Prof. Dr Rengin ELTEM, Fen Bilimleri Enstitüsü Bilimsel Araştırma Projeleri (15-FBE-11).

- Biyoaktif kitooligosakaritlerin kantitatif analizi ve karakterizasyonu (2016). (E.Ü. Bilimsel Araştırma Projeler Birimi; Araştırmacı) Proje Yürütücüsü: Prof. Dr Rengin ELTEM, (16 MÜH 112).

KATILMIŞ OLDUĞU BİLİMSEL ETKİNLİKLER, SERTİFİKALI EĞİTİMLER, VE KURSLAR

- Two weeks **training** on “Environmental Sampling” at Wildlife & Ecology, University of Veterinary & Animal Sciences, Lahore, from March to September 2009.
- **Workshop** on “Controlling Laboratory Bio-Risks”, Quality Operations Laboratory, University of Veterinary & Animal Sciences, Lahore, Pakistan, January 04-05, 2012.
- **Training workshop** on “Current Approaches for the Diagnosis and Control of Avian Mycoplasmas”. University of Veterinary & Animal Sciences, Lahore, September 03-04, 2012.
- **Practical Training** on “Use of Endnote Software in Article and Thesis writing”, University of Veterinary & Animal Sciences, Lahore, September 28-29, 2012.
- **National workshop** on “Newcastle disease: prevention and control in Pakistan”, November 05, 2012.
- **National Awareness Conference** “Tuberculosis a Zoonosis”, Quality Operations Laboratory, UVAS Lahore, April 16, 2013.
- **2nd National Conference** on Current Approaches in Microbiology, Nathia Gali, Abbottabad, Pakistan, June 27-28, 2013.
- **Türkçe Öğrenim Programı**, Türk Dünyası Araştırmaları Enstitüsü, 25 Eylül 2013-19 Haziran 2014.
- LOOPEGE **Lisansüstü Öğrencileri Oryantasyon Programı**, Ege Üniv. Biyomüh. Böl. İzmir. 24-26 Eylül, 2014.
- **Workshop** “MicroRNA cancer biomarkers ad next generation sequencing techniques”, (Turkish-German year of Science and Technology). Gediz University, İzmir, Turkey, November 4-5, 2014.
- **Aşı Bilimi Kongresi ve Çalıştayı**, 28-30 Nisan, 2015, Ege Üniv, İzmir, Turkey.
- **18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi**, 19-18 Aralık, 2015.

KAZANDIĞI BURSLAR

- 01.10.2013-01.06.2018, Türkiye Bursları, Ali Kuşçu Bilim ve Teknoloji Burs Programı, Doktora Bursu.

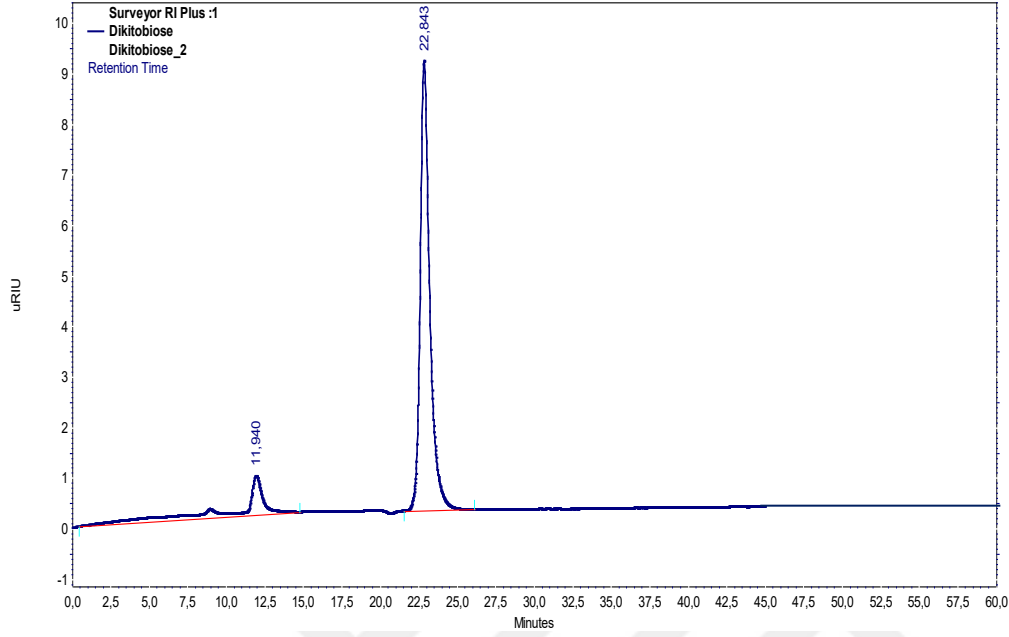
EKLER

Ek 1 HyperRez XP Carbohydrate H⁺ Kolonu Kitoooligosakkaritlerin HPLC Analizileri

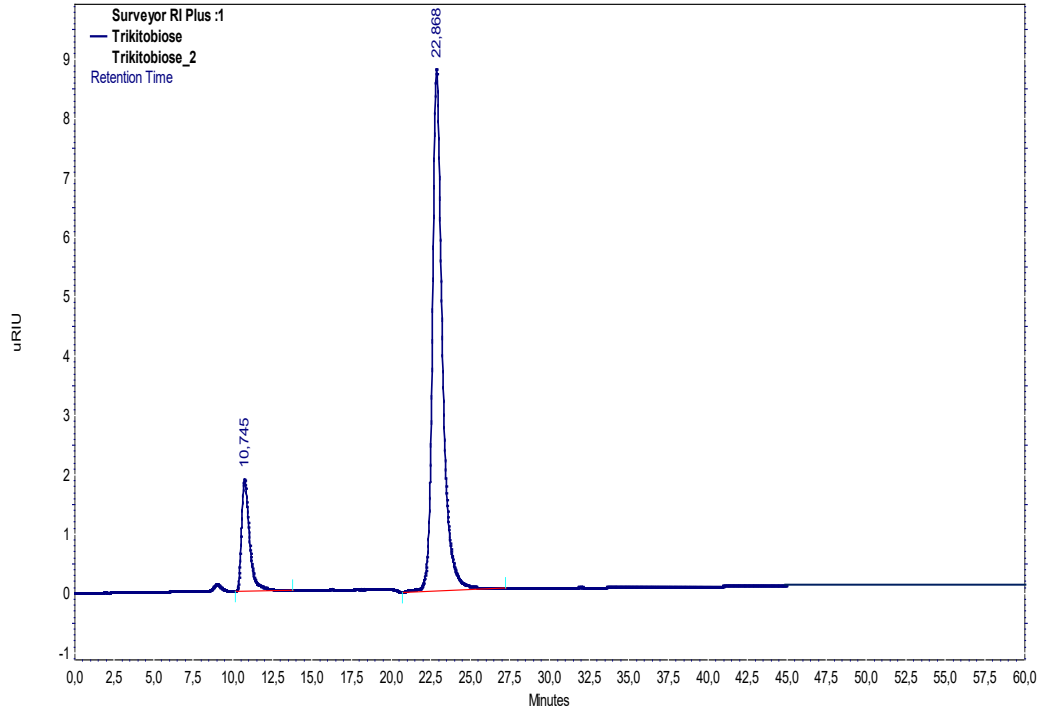
Ek 2 Phenomenex RNM-Carbohydrate Na⁺ Kolonu İle Kitoooligosakkaritlerin HPLC Analizileri



Ek 1. HyperRez XP Carbohydrate H⁺ Kolonu İle Kitooligosakkaritlerin HPLC Analizileri

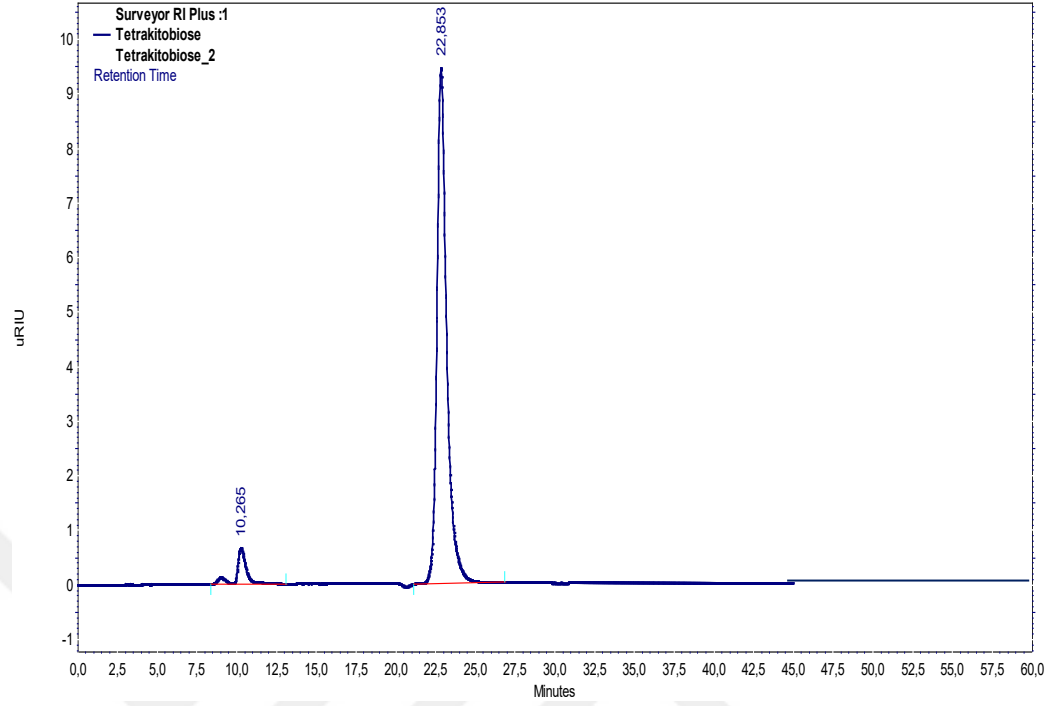


Ek Şekil 1. HyperRez XP Carbohydrate H⁺ kolonu ile 1 mL dk⁻¹ akış hızlarında, 45°C'de kitobiyoz analizi.

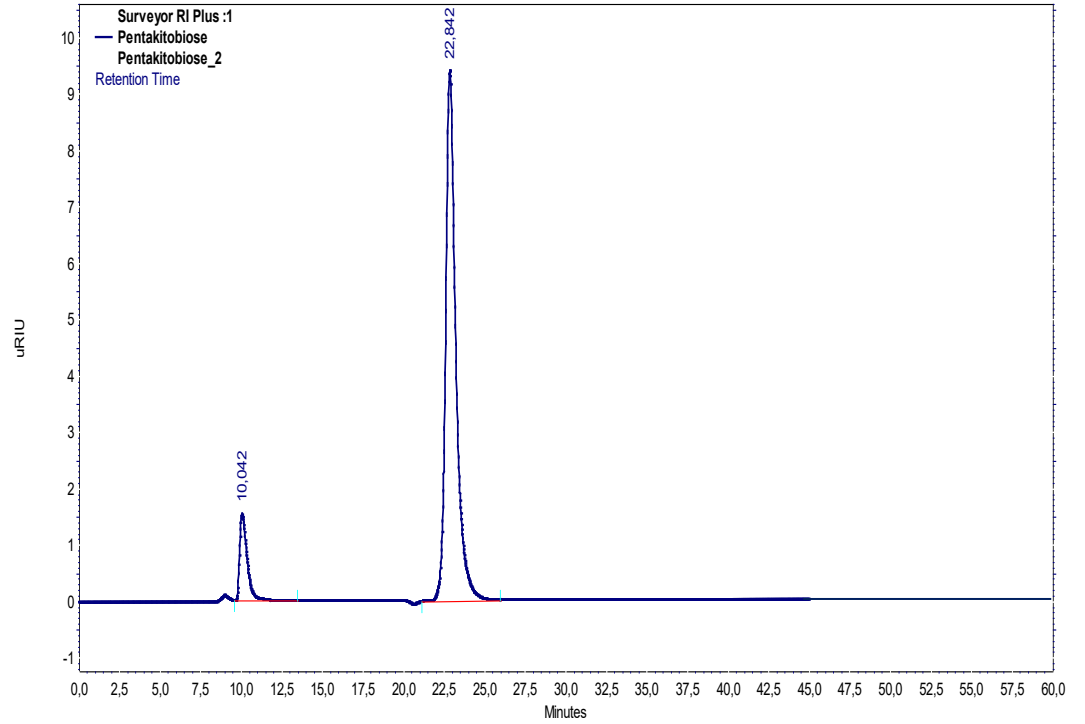


Ek Şekil 2. HyperRez XP Carbohydrate H⁺ kolonu ile 1 mL dk⁻¹ akış hızlarında, 45°C'de kitotriyoz analizi.

Ek 1 (Devam)

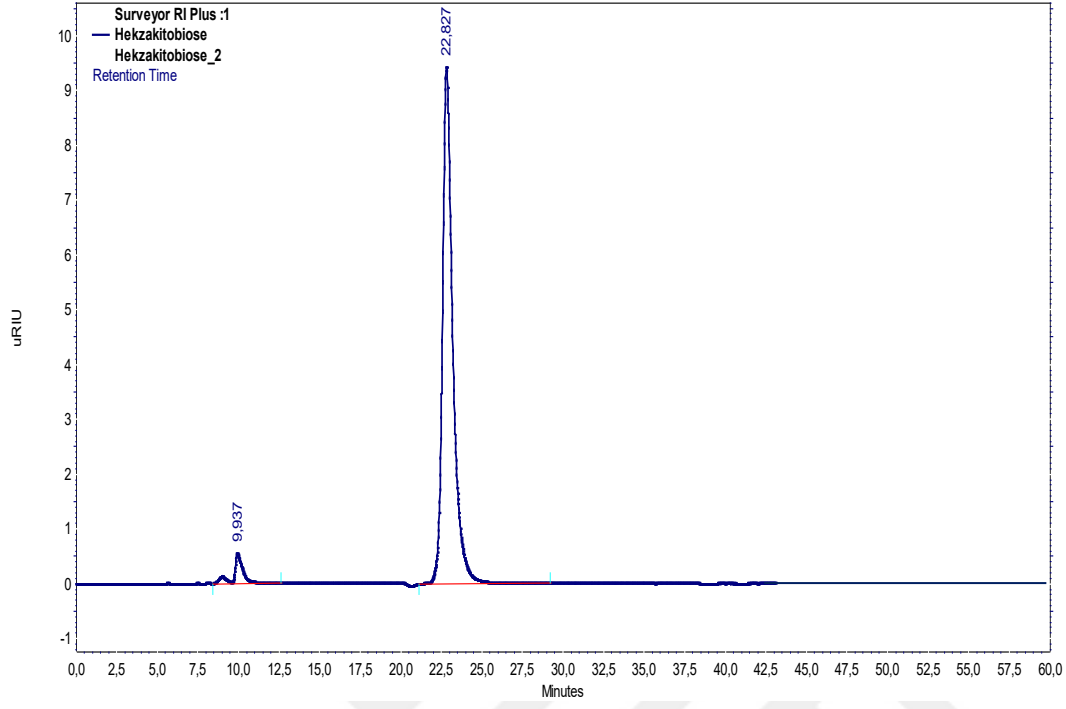


Ek Şekil 3. HyperRez XP Carbohydrate H⁺ kolonu ile 1 mL dk⁻¹ akış hızlarında, 45°C'de kitotetroz analizi.



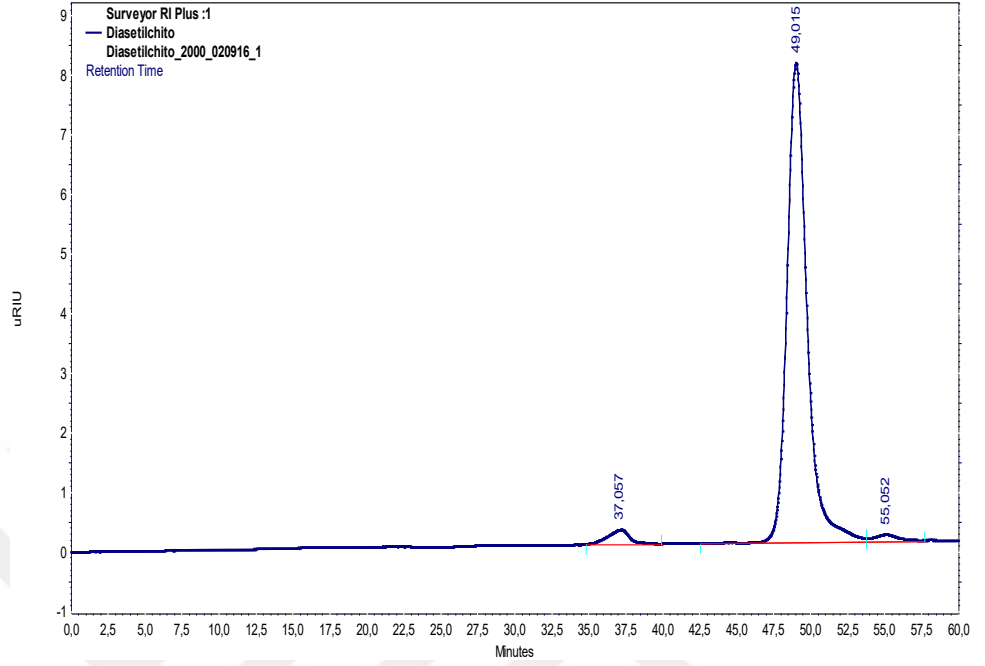
Ek Şekil 4. HyperRez XP Carbohydrate H⁺ kolonu ile 1 mL dk⁻¹ akış hızlarında, 45°C'de kitopentoz analizi.

Ek 1 (Devam)

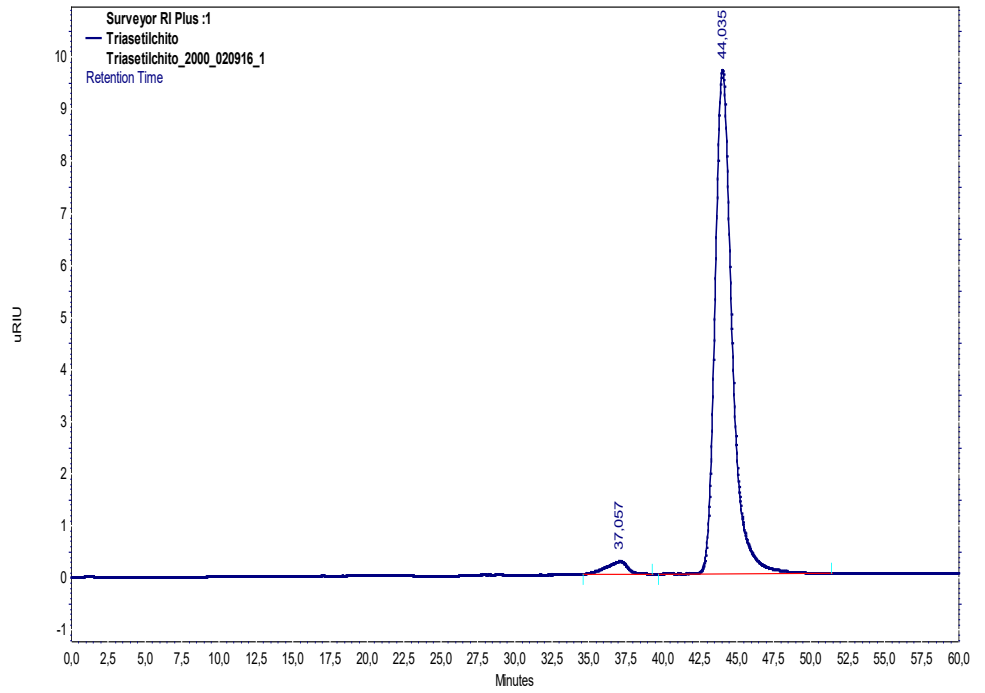


Ek Şekil 5. HyperRez XP Carbohydrate H⁺ kolonu ile 1 mL dk⁻¹ akış hızlarında, 45°C'de kitoheksoz analizi.

Ek 2. Phenomenex RNM-Carbohydrate Na⁺ Kolonu İle Kitooligosakkaritlerin HPLC Analizileri



Ek Şekil 6. Phenomenex RNM-Carbohydrate Na⁺ kolonu ile 0,1 mL dk⁻¹ akış hızlarında, 70°C'de kitobiyoz analizi.



Ek Şekil 7. Phenomenex RNM-Carbohydrate Na⁺ kolonu ile 0,1 mL dk⁻¹ akış hızlarında, 70°C'de kitotrioz analizi.