



**DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN
BACİLLUS PUMİLUS'UN 16S rRNA İLE
MOLEKÜLER TANILANMASI, KİTİNAZ ENZİMİ
AKTİVİTESİ, ENDÜSTRİYE UYGUNLUĞUNUN
ARAŞTIRILMASI**

Yakup Emre KIZILER

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ**

2018

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS*
PUMILUS'UN 16S rRNA İLE MOLEKÜLER TANILANMASI,
KİTİNAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ, ENDÜSTRİYE
UYGUNLUĞUNUN ARAŞTIRILMASI

Yakup Emre KIZILER

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2018

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS PUMILUS*' UN 16S
rRNA İLE MOLEKÜLER TANILANMASI, KİTİNAZ ENZİM AKTİVİTESİ,
ENDÜSTRİYE UYGUNLUĞUNUN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında, Yakup Emre KIZILER tarafından hazırlanan bu çalışma 15/03/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı – Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (oybirliği)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : PROF.DR. ABDULKADİR ÇILTAŞ

İmza :

Üye : PROF.DR. NESLİHAN DİKBAŞ

İmza :

Üye : DR.ÖĞR.Ü. İSMAİL BEZİRGANOĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 05.05.2018 tarih ve 19/21 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS PUMILUS*'UN 16S rRNA İLE MOLEKÜLER TANILANMASI, KİTİNAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ, ENDÜSTRİYE UYGUNLUĞUNUN ARAŞTIRILMASI

Yakup Emre KIZILER

Atatürk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Literatürde tanımlanan kitinaz aynı zamanda kimyasal adıyla β -1,4-N-acetyl glucosamine olarak ta bilinmektedir. Kitinazlar; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Mikrobiyal kaynaklı kitinazlar biyoteknolojik uygulamalar için tercih edilmektedir. Kitinazlar; gıda sanayinde, yem katkısında, kağıt endüstrisinde ve toprak iyileştirmede tercih edilmektedir. Biyoteknolojide ise kitinaz enzimi çalışmaları, enzimi gerek üretmede gerekse özelliklerinin geliştirilmesinde kullanılacak olan etkin bir araçtır.

Bu çalışmada, taze yağlı peynirden izolasyonu yapılmış olan *Bacillus pumilus* suşunun 16S rRNA ile moleküler tanımlanması, bakterinin kitinaz enzimi aktivitesi ve endüstriye uygunluğunun araştırılması amaçlanmıştır. Bakteri 16S rRNA yöntemi ile tanımlanmıştır. % 99 oranında tanımlanan *Bacillus pumilus*'tan üretilen ekstraselüler kitinaz enziminin optimum sıcaklığı 40°C, optimum pH'sı ise 7.0 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre bu bakterinin ürettiği enzimin karakteristik özelliklerinden dolayı endüstriye kazandırılabilceği, gıda sektöründe starter kültür olarak kullanılabilceği çalışmamızla teyit edilmiştir.

2018, 50 sayfa

Anahtar Kelimeler: 16S rRNA, *Bacillus pumilus*, Kitinaz

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

A STUDY ON THE MOLECULAR IDENTIFICATION OF *BACILLUS PUMILUS* ISOLATED FROM NATURAL SOURCES BY 16S rRNA, CHITINASE ENZYME ACTIVITY AND ITS POTENTIAL INDUSTRIAL BENEFITABILITY

Yakup Emre KIZILER

Atatürk University
Institute of Science and Technology
Department of Agricultural Biotechnology
Branch of Enzyme and Microbial Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

The chitinase which is identified in the literature is also known with its chemical name β -1,4-N-acetyl glucosamine. Chitinases are produced by plants, animals and microorganisms. Microbial-derived chitinases are preferred for biotechnological applications. Chitinases are preferred in food industry, feed additives, paper industry and soil improvement. In biotechnology, chitinase enzyme studies are an effective tool to be used in the production of enzymes, or in the development of their properties.

The aim of this study was to investigate the molecular identification of *Bacillus pumilus* strain isolated from fatty cheese by 16S rRNA, to determine its chitinase enzyme activity and to evaluate its possible industrial effectiveness. The identification was performed using the 16S rRNA method. The identification rate of *Bacillus pumilus* was 99 % and the optimum temperature of the extracellular chitinase enzyme was determined as 40°C and the optimum pH was pH 7.0. According to the results, it has been confirmed with our study that the bacterium can be introduced to the industrial use due to the characteristics of the enzyme produced by this bacterium and that it can be used as a starter culture in the food industry.

2018, 50 pages

Keywords: 16S rRNA, Chitinase, *Bacillus pumilus*

TEŞEKKÜR

Bu alıőmanın yűrűtűlmesinde gűstermiő olduėu her tűrlű yardım ve katkılarından dolayı danıőman hocam Sayın Prof. Dr. Neslihan DİKBAŐ'a, teőekkűr etmeyi bir bor bilirim. Ayrıca çalıőmalarımnda her daim yanımda olan yűksek lisans arkadaőlarım Y. Lis. Őėr. Osman MALKOÇ, Y. Lis. Őėr. Merve KIZILKAYA, Y. Lis. Őėr. Kűbra GENÇ, Y. Lis. Őėr. Selda Nur HACIABDULLAHOėLU, Y. Lis. Őėr. Safa Mustafa KILIÇ teőekkűr ederim.

Buėűnlere gelmemi saėlayan ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen aileme, minnettar olduėumu bildirmek isterim.

Yakup Emre KIZILER

Mart, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kitinin Kristal Yapısı	8
1.2. Kitinin Enzimatik Biyosentezi	9
1.3. Kitinazların Sınıflandırılması	10
1.3.1. Amino asit dizilimine dayanarak kitinazların sınıflandırılması	10
1.4. Kitin ve Türevlerinin Kullanım Alanları.....	12
1.4.1. Tıpta kullanım alanları	12
1.4.1.a. Antitümör ajan olarak kullanımı.....	12
1.4.1.b. Ortopedik/ periodantal uygulamalar.....	12
1.4.1.c. Kitin ve kitosan bazlı sargı malzemeleri	13
1.4.1.d. Oftalmoloji (Göz Bilimi).....	13
1.4.1.e. Kontrollü ilaç salınımı	13
1.4.1.f. Antimikrobiyal ajan olarak kullanımı	14
1.4.1.g. Çevre ve kirlilik kontrolü uygulamaları	14
1.4.2. Kitinazların rolü	14
1.4.3. Kitinin enzimatik hidrolizi	15
1.4.4. Kitinazların uygulama alanları	16
1.4.4.a. Biyokontrollerde kullanımları	16
1.4.4.b. Kitooligosakkaritlerin üretimi	16
1.4.4.c. Diğer uygulamalar	17
1.5. <i>Bacilluslar</i>	17
1.5.1. <i>Bacillus</i> cinsi hakkında genel bilgiler	17
1.5.3. <i>Bacillus pumilus</i> ve genel özellikleri.....	18

2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	23
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	24
3.1.3. Kullanılan kitler.....	24
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı	24
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Mikroorganizma izolasyonu ve identifikasyonu	28
3.2.2. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi	28
3.2.3. Çalışmada kullanılan bakteri kültürlerinin muhafazası.....	29
3.2.4. Mikroorganizmanın moleküler tanılanması	29
3.2.4.a. Bakteri izolatlarının DNA izolasyonu	29
3.2.4.b. 16S rRNA bölgesinin PCR yardımı ile çoğaltılması.....	30
3.2.4.c. DNA dizi analizlerinin alınması ve sonuçların değerlendirilmesi.....	31
3.2.5. Bakterilerin inokülasyonu	32
3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçülmesi	32
3.2.6.a. Enzimin optimum pH değerinin saptanması	32
3.2.6.b. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması.....	33
4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR.....	34
4.1. Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi	34
4.2. Moleküler Yöntem ile Bacillus pumilus'un Tanınması	35
4.2.1. DNA izolasyon sonucu.....	35
4.2.2. PCR sonuçlarının jel görüntüsü.....	35
4.2.3. Dizi analizi sonuçları.....	36
4.3. Kitinaz aktivitesi sonuçları	36
4.3.1. Kitinaz enziminin optimum pH sonuçları	36
4.3.2. Kitinaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları.....	38
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	40
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	51

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenozin Trifosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
EC	Enzim Komisyonu
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten sabiti
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterileri
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NCBI	Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
nm	Nanometre
rpm	Dakikada devir sayısı
sp.	Species (tür, tekil)
TCA	Trikloroasetik asit
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U/mg	Unit/miligram
unit/μl	Unit/mikrolitre
v/v	Hacim/Hacim (volüme/volüme)
°C	Santigrat
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzimlerin genel yapısı	5
Şekil 1.2. Anahtar-kilit modeli	6
Şekil 1.3. İndüklenmiş uyum modeli	6
Şekil 1.4. Kitinaz enziminin üç boyutlu yapısı	8
Şekil 1.5. Kitin yapısı	9
Şekil 1.6. <i>Bacillus pumilus</i> bakterisi.....	18
Şekil 4.1. <i>Bacillus pumilus</i> bakterisinin koloni görünümü.....	34
Şekil 4.2. <i>Bacillus pumilus</i> (N-6)'a ait elektroforez görüntüsü	35
Şekil 4.3. <i>Bacillus pumilus</i> (N-6)'un PCR Reaksiyonu Sunucu Jel görüntüsü	36
Şekil 4.4. <i>Bacillus pumilus</i> 'tan elde edilen ekstraselüler kitinaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	37
Şekil 4.5. <i>Bacillus pumilus</i> 'tan elde edilen ekstraselüler kitinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzim kaynakları ve kullanım alanları	3
Çizelge 4.1. Bacillus pumilus'un optimum pH absorpsiyon (A) değerleri.....	37



1. GİRİŞ

Biyoteknoloji; bitki, hayvan ve mikroorganizmaların tamamı veya bir parçası kullanılarak kısa sürede yararlı ticari ürünlere dönüştürülen yeni bir organizma elde etmek ve var olan bir organizmanın genetik yapısında arzu edilen değişiklikleri meydana getirmek, bir anlamda kendi talebini yaratmak için belirli yönde yapılan değişiklikler bütünüdür. Biyoteknoloji temel bilim verilerini kullanarak canlıların iyileştirilmesi ya da endüstriyel kullanıma yönelik ürünlerin ve aynı zamanda modern teknolojinin sorunlarına fayda sağlamak amacıyla geliştirilmiş uygulamalı metotlar bütünü olarak kabul edilir.

Biyoteknolojik olarak enzimlerle ilgili; genomik, proteomik ve yönlendirilmiş mutagenizasyon teknikleri kullanılarak üretimlerinin yapılması, hedef protein ve enzimlerde yapı-işlevlerin aydınlatılması, rekombinant mikroorganizmalarla bu enzimlerin üretilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca farklı çevre ve habitatlardan kültüre edilemeyen mikrobiyal kaynaklar endüstriyel amaçlı değerlendirilmektedir (Anonim 2017a).

Biyoteknolojinin ana bilim dallarından biri olan mikrobiyal biyoteknoloji; enzim üretimi, endüstriyel açıdan biyoremediasyon, verimliliğin artırılması, insan ve hayvan sağlığı için önemli proteinlerin kopyalanması ve üretimi gibi birçok dalda çalışır. Enzim teknolojisinin gelişmesi, kullanılan ürünlerin çeşitliliği ekonomik değerinin yüksekliği nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar giderek önem kazanmıştır. Son yıllardaki stratejik alan olarak değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak üretilen enzimler büyük miktarlara ulaşmış ve yaygınlaşmıştır. Mikroorganizmaların endüstriyel boyutta kullanımları için doğadan elde edilebilirlikleri oldukça önem kazanmaktadır. Endüstriyel mikroorganizmaların bütün suşlarının tek kaynağı doğadır. İstenen ürünü en fazla üretebilen mikroorganizmaların seçilerek izole edilmeleri, genetik tanımlanmaları ve bunlardan enzim eldesi endüstriyel suşların geliştirilmesi yaygın kullanılan bir biyoteknolojik uygulamadır.

Farklı ekosistemlerden endüstriyel enzim üreticisi mikroorganizmaların taranması, izolasyonu, konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, seçilen enzimlerin mikrobiyal proses teknolojileri ile üretim optimizasyonu, saflaştırılması, immobilizasyon süreçlerinin geliştirilmesi ve pazara yönelik formülasyonlarının oluşturulması bu alanın temel etkinlikleri arasındadır (Anonim 2017b).

Enzimler hücre içerisindeki biyolojik faaliyetlerde biyokimyasal olayları katalizleyen ve katalitik fonksiyonlara sahip olan protein molekülleridir. Hücre içerisinde ve hücre dışında birçok biyokimyasal reaksiyondan sorumludurlar. Enzimlerin monomerlerini aminoasitler oluşturur. Enzimler farklı ortamlarda ve substratlarda çalışabilme yeteneklerine göre, çalışma alanı olarak ilgi kaynağı olmuşlardır (Enzyme Technical Association 2001; Wolfson *et al.* 2008).

Enzimler günümüzde pek çok kullanım alanına sahiptirler. Bu alanlardan bazıları; gıda (tatlandırıcılar, çikolata şurupları, fırın ürünleri, alkollü içecekler, önceden pişirilmiş tahıllar, süt ürünleri vs) sanayi, deterjan endüstrisi, kağıt üretimi, deri işleme, yem sanayii, tekstil endüstrisi ve tıpta teşhis ve tedavidir (Daniels 1992; Kirk *et al.* 2002).

Çizelge 1.1. Enzim kaynakları ve kullanım alanları (Madigan *et al.* 1997)

ENZİMLER	KAYNAK	KULLANILDIĞI YER	ENDÜSTRİSİ
Amilaz (nişastayı parçalar)	Mantar	Ekmek	Fırın
	Bakteri	Nişasta tabakası	Kağıt
	Mantar	Şurup ve glikoz	Yiyecek
	Bakteri	Düşük ısıda çamaşır kolalamada	Kolalama
	Mantar	Sindirime yardımcı ilaç	İlaç
	Bakteri	Kumaş tabakalarının uzaklaştırılması	Tekstil
	Bakteri	Lekelerin uzaklaştırılması, deterjanlar	Çamaşır
Proteaz(protein parçalayıcı)	Mantar	Ekmek	Fırın
	Bakteri	Leke uzaklaştırıcı	Kuru temizleme
	Bakteri	Yara temizleyici	İlaç
	Bakteri	Kumaş tabakalarının uzaklaştırılması	Tekstil
	Bakteri	Ev deterjanı	Çamaşır
	Bakteri	Etin yumuşatılması	El
	Bakteri	Yumuşak şekerler	Şeker
Invertaz(sükroz parçalayıcı)	Bira mayası	Yumuşak şekerler	Şeker
Glukoz izomeraz	Bakteri	Yüksek fruktoz Mısır şurubu	Hafif içkiler
Glukoz oksidaz	Mantar	Glukoz uzaklaştırma	Yiyecek
		Oksijen uzaklaştırma	Yiyecek
		Diabetliler için ilaç	İlaç
Pektinaz	Mantar	Sıkıştırma saflaştırma	İçki, meyva suyu
Rennin	Mantar	Sütün koagülasyonu	Peynir
Selüloz	Bakteri	Kumaş yumuşatıcı, Parlaticı, deterjan	Deterjan
Lipaz	Mantar	Yağı parçalar	Süthane, çamaşırhane
Laktaz	Mantar	Laktozu, glukoz ve galaktoza parçalar	Süthane, besinler
DNA polimeraz	Bakteri, Archaea	PCR ve DNA replikasyonu	Biyolojik araştırma, adli tıp

Enzimler, C, O, H ve N oluşan, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden, vücutta biyokimyasal olayları düzenleyerek biyolojik olarak reaksiyonları gerçekleştiren biyokatalizörlerdir. Enzimler, besleyici moleküllerin yıkıldığı, kimyasal enerjinin depolandığı ve şeklinin değiştirildiği, basit yapıya sahip moleküllerden, biyolojik makromoleküllerin yapıldığı, metabolik yollarda yüzlerce reaksiyonu katalize eden protein yapıya sahip moleküllerdir (Karademir vd 2002; Nelson and Cox 2004).

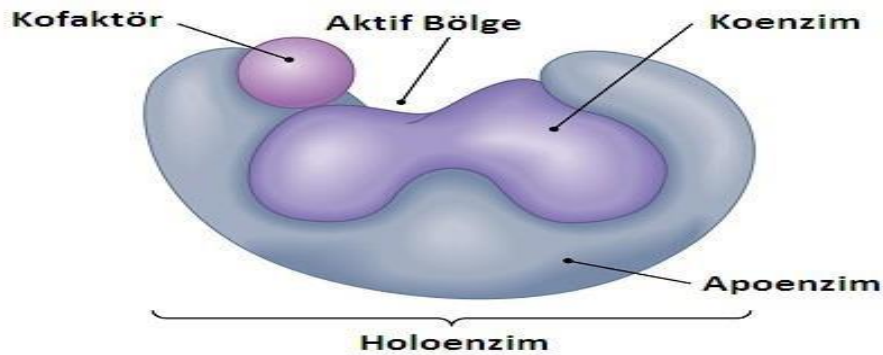
Bilinen bütün enzimler protein yapıdadırlar ancak istisnai olarak katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu protein yapısında değildir. Enzim denatüre olur ve aminoasit bileşenlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi daimi kaybolur. Bu sebeple enzim yapıları primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner olarak bulunur ve katalitik aktivite için esastırlar (Nelson and Cox 2004).

Enzimler mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler ekstraselüler ve intraselüler olmak üzere 2'ye ayrılır.

- 1. Ekstraselüler Enzimler:** Besiyeri veya hücre dışında bulunan besin maddesini hidrolize ederek mikroorganizmalar tarafından alınımı sağlar. Ekstraselüler enzimlerin stabiliteyi yüksek olduğu için çevre koşullarında uzun süre aktiviteyi koruyabilirler.
- 2. İntraselüler Enzimler:** Hücre sitoplazmasında dağılık halde bulunurlar ve genel substratları şekerler, aminoasitler, karboksilik asitler gibi hücre zarından kolayca geçebilen moleküllerdir.

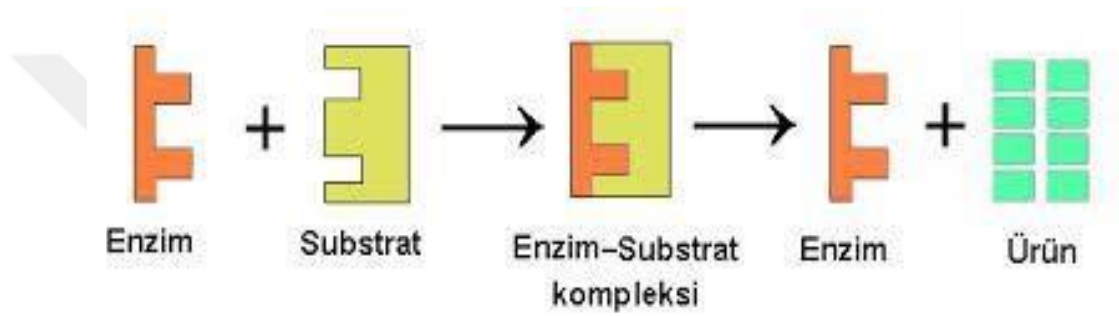
Enzimler sadece proteinden oluşmasına rağmen çoğu enzim çalışma yerleri ve yapılarına göre iki farklı gruptan oluşur. Bu gruplar apoenzim ve koenzim-kofaktör olarak isimlendirilir.

- 1. Apoenzim:** Genel olarak enzimin spesifikliğini belirleyerek reaksiyonlara katılan kısımdır. Apoenzim kısmı protein yapılı olduğundan dolayı ısı ile muamelesinde denatüre olarak özelliğini kaybeder.
- 2. Kofaktör:** Genel olarak iki yapı sergiler ya Fe^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} gibi inorganik iyon ya da koenzim diye adlandırılan organik veya metalloorganik kompleks yapılı moleküllerdir.
- 3. Koenzim:** Organik ve inorganik maddelerden meydana gelmiş ve enzimin etkin bir biçimde reaksiyonları katalizleyebilmesi için apoenzim varlığında etkinlik gösterir. Tek başına etkin olamamaları nedeniyle kendine yardımcı olarak vitaminlerin bulunması gerekir (Pandey and Ramachandran 2006).
- 4. Aktif Bölge:** Enzim molekülü üzerinde, substrat bağlama özelliğine sahip özel bölgedir; substratı tutar ve enzim-substrat kompleksi oluşur. Substratın ürüne dönüşmesiyle oluşan enzim-ürün kompleksinden enzimin ayrılmasıyla ürün serbestleşir.
- 5. Haloenzim:** Apoenzimin yardımcı kısım ile birlikte oluşturdukları aktif yapıya denir.



Şekil 1.1. Enzimlerin genel yapısı (Anonim 2017c)

Enzimlerin reaksiyon göstermesi için gerekli olan bileşiğe “substrat” adı verilir. Enzimin substrat ile etkileşime girmesi sonucu ortaya çıkan yapıya ise “ürün” denir. Enzim substrat ilişkisi bağlanma yapılarına göre 2 ana model öne sürülmüştür. İlk model 1894 yılında ileri sürülmüş olan anahtar-kilit modeli Emil Fischer tarafından, substratın bağlanması enzimin aktif bölgesine olacağı için ikisi arasında bir yapı bütünlüğünün anahtar-kilit gibi bağlanmasını kabul etmiştir (Şekil 1.2) (Nelson and Cox 2004; Açıklık vd 2006).



Şekil 1.2. Anahtar-kilit modeli (Anonim 2017d)

İkinci olarak ise 1958’ de indüklenmiş uyum modelini öne süren Daniel Koshland, bu modelin enzimin substrat yokluğunda serbest durumda olduğunu, substrat varlığında ise enzim parçalayacağı substrata göre şekil aldığını belirtmiştir. Enzimin reaksiyona girdiği substrat parçalandığında ve reaksiyon tamamlandığında enzimin herhangi bir değişikliğe uğramadan ayrılacağını ve başka bir reaksiyonda aktif rol oynayacağını belirtilmiştir. Enzimler genel anlamda çift yönlü reaksiyonlarda bulunurlar (Nelson and Cox 2004; Açıklık vd 2006).



Şekil 1.3. İndüklenmiş uyum modeli (Anonim 2017e)

Enzimler çalışacağı maddeye göre değişiklik gösterirler. Bu da çalışacağı substrata spesifik olduğunu ifade eder. pH ve ılımlı sıcaklık altında sulu çözeltilerde aktivite gösterirler.

Enzimler yapı olarak sıcaklık ve pH'ya duyarlıdır. Hücre içi etkinliğe sahip olmakla birlikte hücre dışında da birçok etkinliğe sahiptirler. Bunun nedeni ise globüler yapıda bulunup, molekül içi veya moleküller arası bağlar ile sekonder ve tersiyer yapıda tutunmalarıdır (Bhat 2000).

Mikrobiyal kaynaklar maliyet tutarlılık, üretim gibi proseslerde daha az zaman harcanması, işlem modifikasyon ve optimizasyonunun kolaylığı gibi avantajlarından kaynaklanan sebeplerden dolayı endüstriyel üretimde kullanılmaktadır (Prakash and Jaiswal 2010).

Endüstriyel alanda kullanılan birçok mikrobiyal enzimler birçok mikroorganizma tarafından sentezlenirler. Biyoremidasyon çalışmalarının temel konularından biri olan kitinin parçalanması endüstriyel olarak oldukça önemlidir. Son yıllarda biyoremidasyon çalışmalarının en büyük destekçisi bakteriler tarafından üretilen kitinaz enzimidir.

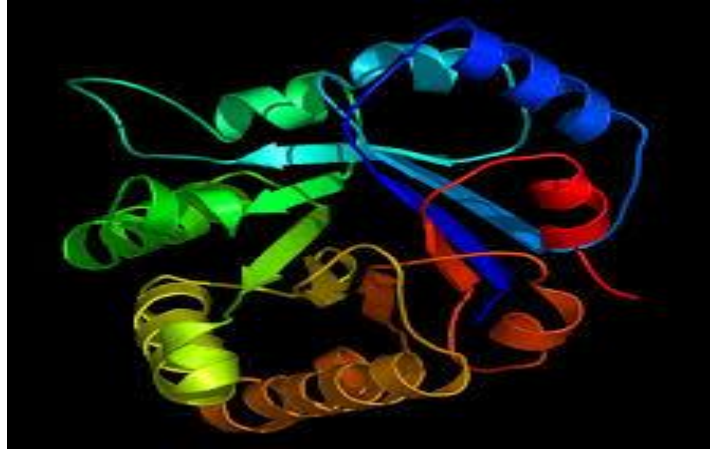
Kitin terimi Yunanca'dan gelmekte olup katı, sert anlamını taşımaktadır. Sistematik adı (1,4)-2-deoksi- β -d-glukan olan kitin β (1,4) bağlı N-asetilglukozamin birimlerinden oluşan doğrusal bir polisakarittir. Selülozdan sonra da doğada en fazla bulunan biyopolimer olarak bilinir Kitin genel olarak mantarların hücre duvarında, böceklerin, ahtapotların dış iskeletlerinde, krustase kabuklularının yapısal bileşeninde bulunurlar. Kitin, mantarlarda hücre duvarlarının % 22-% 44'ünü oluşturur ve deniz kaynaklarına oranla çok az miktardadır (Muzzarelli 1977; Gooday *et al.* 1980; Deshpande 1986; Flach *et al.* 1992; Chen and Chang 1994; Muzzarelli and Muzzarelli 1998; Patil *et al.* 2000; Cauchie 2002; Tanaka *et al.* 2003; Adams 2004; Hoell *et al.* 2005).

1.1. Kitinin Kristal Yapısı

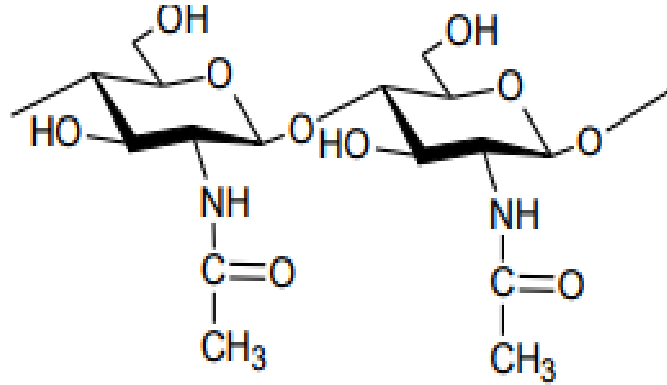
Kitinler üç polimerik formda bulunurlar. Kristal bölgelerin içinde bulunan zincirlerin farklı sıralanması ve düzenlenmesi ile oluşan α , β ve γ kitindir. En fazla bulunan ve kolayca elde edilebilen formu α kitindir. Moleküller form olarak antiparalel şekil alırlar (Şekil 1.4) (Minke and Blackwell 1978).

Moleküler düzen olarak bu halde bulunmaları güçlü moleküller arası hidrojen bağları için uygun olup, stabil olarak bulunan formu ise α kitindir (Şekil 1.5). Zayıf moleküller arası güçlere sahip olan formu ise β kitindir. Paralel bir düzende toplanmaları daha zayıf moleküller arası güçlere neden olur (Gardner and Blackwell 1975; Mazeau *et al.* 1994).

β kitinin α kitine oranla daha az kararlı bir yapıda oluşu düşünülmektedir. Çözülme ve şişme halinde β kitin α kitine dönüşür fakat tersi söz konusu değildir (Rudall and Kenchington 1973).



Şekil 1.4. Kitinaz enziminin üç boyutlu yapısı (Anonim 2017f)



Şekil 1.5. Kitin yapısı (Yoruç ve Uğraşkan 2017)

1.2. Kitinin Enzimatik Biyosentezi

Kitinin sentezi substrat olarak UDP-N-asetilglukozamin monomerlerini kullanan kitin sentaz enzimi [E.C. 2.4.1.16] tarafından katalizlenmektedir. Bu enzim sadece Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Ca^{+2} gibi iki değerlikli katyonların varlığında aktif olur (Merzendorfer and Zimoch 2003).

Enzimatik olarak aktivitesinin belirlenmesi, Candy ve Kilby tarafından 1962 yılında öne sürülen glukozda kitin oluşumunun biyosentez yoluyla başlamış ve radyoaktif işaretli öncül madde çalışmalarıyla da desteklenmiştir. Böceklerde kitin biyosentezinin genetik ve biyokimyasal çalışmaları tamamlanmıştır (Merzendorfer ve Zimoch 2003).

Kitin biyokimyasal olarak heksoamin yolağı üzerinden gelmektedir. Heksozamin yolunda fruktoz-6-fosfat UDP-N-asetilglukozamin'e dönüştürülerek UDP-N-asetilglukozamin kitin sentaz enzimi ile kitin oluşturmak üzere polimerleştirilir. Glukozamin-6-fosfat N-asetiltransferaz (GNA) [EC:2.3.1.4] heksozamin yolunda görevli enzimlerden biridir ve glukozamin-6-fosfatın birinci amin grubuna Asetil-CoA'dan aldığı asetil gruplarının transferleri de gerçekleştirilir (Candy and Kilby 1962; Kramer and Koga 1986).

1.3. Kitinazların Sınıflandırılması

Selüloz ve kitinin molekül yapıları olarak benzerlikleri olmasına rağmen kendi hidrolitik enzimleri olan selülaz ve kitinaz birbirlerinden farklı özellikler gösterir. Sınıflandırma ve termonolojileri IUBMB'nin Nomenklatur Komitesi tarafından yapılmıştır (Patil *et al.* 2000).

Okzo-hidrolitik enzimler polimerlere etki eder ve substratın zincir uzunluğunun azalmasına bağlı olarak enzimlerin afinitelerini azaltır. Bu enzimlerin çoğu polimerik substrat üzerine etki etmekte oldukça zayıftır, bunun sebebi glikosidazların dimerler üzerinde daha fazla afiniteye sahip olması ve KM değerlerinin diğer zincir uzunluğunun artışı ile artmasıdır (Rast 1993).

1.3.1. Amino asit dizilimine dayanarak kitinazların sınıflandırılması

Kitinazların evrensel olarak akrabalıklarının sınıflandırılmasında IUBMB'nin yardımı dokunmamaktadır. Glikoliz hidrolazları üç aile olarak gruplandırılmıştır. Aminoasit dizilimlerine bağlı olarak Henrisat'i kitinazları ve N-asetilheksozaminidazların grupları 18, 19 ve 20 olarak bilinmektedir. Kitinaz gen dizilerinin tanımlı hale getirilmesiyle birlikte, Perrakis ve arkadaşları tarafından iki sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflandırmada I.sınıf 19. Aileyi ve II.sınıf 18. Aileyi kapsayacak şekilde oluşturulmuştur (Henrisat 1991; Perrakis *et al.* 1993).

Bu aile gruplarına göre 18. ve 19. grupta bulunanlar mantar, böcek, bakteri, virüs ve bitki gibi organizmalardan elde edilen endo-kitinazlardan oluşmaktadır. Bitkiler 19. aile grubunda bulunmakadır. 20. aile grubunda ise vibrioharveyiden elde edilen N-asetilglukozaminidazlar [E.C.3.2.1.30] ve Dictyostelium discoideum ile insalardan elde edilen N-asetilheksozaminidazlar [E.C.3.2.1.52] bulunmaktadır. 1993'te yapılan bir çalışma sonucu Hanrisat ve Bairoch *flavobakterium* türlerinden elde edilen endo-N-asetilglukozaminidazları [E.C.3.2.1.92] 18.aile içerisine almışlardır (Henrissat and Bairoch 1993).

Bitkiler büyük miktarda kitinaz izomerleri üretirler. Bunun nedeni bitkilerin patojenlere karşı savunma oluşturmalarıdır. Bu izomerler her doku için farklılık gösterirler ve bu nedenle dokulara özgüdürler ve dokuların gelişimlerine bağlı olarak düzenlenirler. Kitinazlar dizi özelliklerine göre alt sınıflar içerisinde bulunurlar (Iseli *et al.* 1996).

Kitinazların sınıflandırılması yapılırken göz önünde bulundurulması gereken tanımlayıcı birkaç özellik mevcuttur. Bu özellikler;

- N-terminal Dizisi
- Enzimin Lokalizasyonu
- İzoelektirin pH'sı
- Sinyal Peptit
- İndükleyici Moleküllerdir (Flach *et al.* 1992).

Bu sınıflandırmaya göre enzim izomerleri diz özelliklerine göre 6 ana sınıfta toplanmaktadır. Bu enzimler örneklendirme açısından sıralanırsa sınıf I enzimler kitinazların karakteristik özellikleri içerir bunlar; sisteinden zengin N terminal bölgeleri, lösin ya da valinden zengin sinyal peptitleri ve vakuol içindeki lokalizasyonları olarak belirlenebilir. Sınıf I enzimler bazik ve asidik olmalarına göre sınıf Ia ve sınıf Ib olarak alt gruplara ayrılmıştır. Bu sınıflandırma içerisinde bitki kitinazları sınıf I içerisinde bulunur. Sınıf I kitinazlarının geneli endokitinazlardır (Colinge *et al.* 1993).

Sınıf II kitinazları, sınıf I kitinazları ile benzer dizi sıralamasına sahiptirler ancak sisteince zengin N-terminal domainleri bulunmamakla birlikte patojen kaynaklıdır. Sınıf II enzimleri mantar, bitki ve bakteriler içerisinde toplamaktadır. Sınıf II kitinazları ekzoekin kitinazlarıdır ancak sınıf I kitinazların endokitinaz olması gibi sınıf II'nde kesinliği henüz kanıtlanamamıştır (Colinge *et al.* 1993).

Sınıf VI kitinazları, immünolojik olarak sınıf I enzimlerinin karakteristik özelliklerine sahiptirler ancak önemli derecede sınıf I kitinazlarına benzer primer yapıya sahiptirler (Colinge *et al.* 1993).

1.4. Kitin ve Türevlerinin Kullanım Alanları

Kitin ve kitin türevleri önemli özellikleri sayesinde tıp alanında oldukça fazla kullanılmaktadır. Kitin ve kitosan ticari açıdan önemli bir yere sahiptir, bunun başlıca sebebi yüksek miktarda (%6,98) N içermesidir (Kumar 2000; Synowiecki and Al-Khateeb 2003).

Kitin ve kitosanın son yapılan çalışmalar ile toksik veya alerjik etki göstermediği saptanmıştır. Bu nedenle vücudun bu bileşikleri istilacı veya yabancı olarak görmesinin mümkün olmadığı gözlenmiştir. Kitin antifungal özellikleri sayesinde tarımsal alanda kullanılması oldukça avantajlıdır (Kumar 2000).

Kitin zayıf çözünürlüğü sebebiyle kullanımını sınırlıdır. Buna rağmen kitin ve türevleri pek çok uygulama alanına sahiptirler.

1.4.1. Tıpta kullanım alanları

1.4.1.a. Antitümör ajan olarak kullanımı

Antitümör ajan olarak kitosanın suda çözünür formu kullanılmaktadır. Belirli bir kısmı depolarize edilmiş kitosanın kemirgen peritoneal makrofajları uyardığı, tümör hücrelerini öldürdüğü ve antitümör aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Muzzarelli 1996).

1.4.1.b. Ortopedik/ periodantal uygulamalar

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sert doku yerine kullanılabilirlik üzerine polimer matris-kalsiyum temelli bileşik sistemlerinin araştırmaları yapılmaktadır. Kalsiyum bileşiklerinin dağılımını engelleyen polimer atrisin bağlayıcı özelliklerinden dolayı avantajlıdır. Örnek olarak polimerin hidroksiapatit ile kombinasyonunun hidroksiapatitin osteoiletken (kemik-iletken) davranışını maksimuma çıkardığı ve

böylece matriks emildikçe implantta kemiksi gelişim sağladığı gözlenmiştir. Kemik ve periodantal dolgu malzemesi olarak kullanım potansiyeli olan hidroksiapatit-kitosan mikromosferler (içi boş küresel tanecik) hazırlanmıştır (Sunny *et al.* 2002).

Wan ve arkadaşları hidroksiapatiti kitinde disperse ederek yeni bir hidroksiapatit-kitin kompozit materyal elde etmişlerdir (Khor and Lim 2003).

1.4.1.c. Kitin ve kitosan bazlı sargı malzemeleri

Muzzarelli yaptığı çalışmalar sonucu yeni bir kitosan türevi bulmuştur. Bulduğu kitosan türevi 5-metilprolidinon' un tıpta kullanılabileceği düşünülmektedir. Tıpta uygulama alanı olarak ise yaralarda lizozim etkisiyle üretilen oligomer yapıya dönüştüğü gözlenmiştir (Muzzarelli *et al.* 2002).

1.4.1.d. Oftalmoloji (Göz Bilimi)

Kitosan göz bozuklukları için kontakt lens yapımı sırasında gerekli olan tüm özelliklere sahip materyaldir. Lens de istenilen ve olması önem taşıyan optik berraklık, mekanik dayanıklılık, optik malzeme, gaz geçirgenliği ve immün sistemi ile uyumluluk gibi özellikler kitosan da bulunmaktadır (Kumar 2000).

1.4.1.e. Kontrollü ilaç salınımı

Kitosan biyolojik olarak kolay emilir ve toksik değildir ve midede tahrişi engelleyen anti-ülser etkiye sahiptir. Bu nedenle ilaç yapımında kullanılması uygundur (Kumar 2000).

1.4.1.f. Antimikrobiyal ajan olarak kullanımı

Kitosanların toksik olmaması ve mikroorganizmalara karşı etkinliği göz önüne alındığında, pek çok antibiyotik maddenin kullanıldığı hastanelerde etkin bir antimikrobiyal ajan olarak görev yapması beklenilmektedir. Lee ve Cho yaptıkları çalışmalarda kitosan ile muamele edilen pamuklu kumaşlarda, koloni sayısında %90'a varan azalma tespit etmiş ve kumaşa kan itici özellik kazandırdığını gözlemiştir (Lee *et al.* 1999).

1.4.1.g. Çevre ve kirlilik kontrolü uygulamaları

Atık su arıtımında kullanılan kitosanlar ve türevleri ağır metal şelatlama ajanı olarak geniş kullanım alanına sahiptirler. Atık sularda bulunan pestisitlerin ve fenollerin geri kazanılmasında, renklendiricileri ise uzaklaştırmada çokça kullanılmıştır (Cohen and Chet 1998; Shahidi *et al.* 1999; Kumar 2000).

Diğer uygulama alanlarına örnek verilmesi gerekirse bunlar; kozmetik, kağıt endüstrisi, fotoğrafçılık ve veterinerliktir (Spindler and Spindler 1990; Gergopapadakou and Tkacz 1995; Hirano 1996; Cohen and Chet 1998; Kumar 2000).

1.4.2. Kitinazların rolü

Kitinazlar farklı substrat spesifikliği gösterir ve diğer özellikleri ile çeşitli fonksiyonlar üstlenirler. Bakterilerde ise kitinazlar; beslenme, mantar, protozoa ve omurgasızlara karşı parazitlikle rol oynarlar. Bitki ve omurgalıların savunma mekanizmalarında görev yaparlar (Gooday 1995).

1.4.3. Kitinin enzimatik hidrolizi

Kitin ve selüloz gibi polisakkaritlerin enzimatik hidrolizi, çeşitli enzimlerin birlikteliğini gerektiren kompleks bir işlemdir. Genel olarak polisakkarit zincirini rastgele hidrolizleyen endo-enzimler, zincirin ucunda ya da ucuna yakın olan bir bölgede etkin ekzo-enzimler olarak iki grupta incelenirler. Enzimatik reaksiyonun yönü, tipik olarak indirgenmiş uç gruplarının konsantrasyonunu ölçen çeşitli kolorimetrik tayinlerden faydalanılarak izlenir (Horn and Eijsink 2004).

Birçok bitki, böcek ve mikroorganizma kitinin yıkımından sorumlu olan kitinolitik enzim sistemine sahiptir (Patil *et al.* 2000).

Kitin ilk aşamada endo ve ekzo-kitinazların kombinasyonu ile glukozamin dimerlerine (GlcNAc₂) parçalanır (reaksiyon 1 ve 2). Daha sonra β -N-Asetilglukozaminidaz (GlcNAcase; reaksiyon 3) GlcNAc dimerlerini hidrolizler veya kitooligosakkaridlerden GlcNAc'lerin salınımını gerçekleştirir (Gooday 1994).

Bazı organizmalar GlcNAc₂ ünitelerini GlcNAc₂ fosforilaz enzimi ile GlcNAc ve GlcNAc-1-fosfata parçalar (reaksiyon 4), veya bir GlcNAc₂ fosfotransferaz sistemi ile dimeri GlcNAc-6-fosfat-GlcNAc yapısına dönüştürür (reaksiyon 5). Bu yapı 27 6-fosfo- β -glukozaminidaz ile GlcNAc ve GlcNAc-6-fosfata parçalanır (reaksiyon 6) (Keyhani and Roseman 1997; Keyhani *et al.* 2000).

Kitinin yıkımı için bir diğer yol ise kitinin kitin deasetilaz ile deasetilasyonudur. Deasetillenmiş kitin yani kitosan bir endo-etkin enzim olan kitosanaz ve ekzo- β -D-glukozaminidazın (GlcNase) işbirliği ile glukozamine (GlcN) kadar yıkılır (Gooday 1994).

1.4.4. Kitinazların uygulama alanları

Kitinazlar uygulama alanı olarak çok farklı preparasyonları ile farklı endüstri ve tarım alanlarındaki uygulamalarda kullanılmaktadır (Shaikh and Deshpande 1993; Patil *et al.* 2000).

Bitkilerdeki patojenik mantarlara karşı biyokontrol uygulama alanlarında ilk sıralarda gelmekte ve kitin oligosakkaritlerinin üretimi ve tek hücre proteini üretimi oluşur (Patil *et al.* 2000).

1.4.4.a. Biyokontrollerde kullanımları

Böceklerin dış kabuklarında ve patojenik küf mantarlarının hücre duvarları kitin içerdiğinden bitkiler savunma cevabı olarak kitinaz indüksiyonunu gerçekleştirirler (Kombrink and Somssich 1995).

En çok çalışılan mikoparazitik mantar olan *T. harzianum* kitinolitik enzimlerinin diğer kaynaklardan elde edilen enzimlerinkinden daha geniş bir patojenik mantar aralığına inhibitör etkisinin olduğu bulunmuştur (Lorito *et al.* 1993).

1.4.4.b. Kitoooligosakkaritlerin üretimi

İnsan vücudunda glukozdan sentez edilen, glikoprotein ve glikozaminoglikanlara bağlı olarak bulunan GlcNAc kendi başına anti-inflamatuar bir maddedir. Yüksek miktarda ekzo-kitinaz ve N-asetilglukozaminidazların sentetik olarak eldesi için ihtiyaç vardır (Aloise *et al.* 1996).

1.4.4.c. Diğer uygulamalar

Tek hücre proteini üretimi ve biyoteknolojide kullanılan bir çok kitin türevinin hazırlanmasında kitinazlar kullanılmaktadır (Revahmoiseey and Carroad, 1981; Kumar 2000).

1.5. *Bacillus*lar

1.5.1. *Bacillus* cinsi hakkında genel bilgiler

Bacillus cinsi bakteriler çubuk şeklinde olup *Bacillaceae* familyasına dahildirler. Yapıları gereği gram pozitif, aerobik veya fakültatif anaerobik olup spor oluşturarak 20-30 °C'de ürerler. Vejetatif şekilleri dayanıksızdır. Sporları bazı kaynama noktalarına birkaç saat dayanabilir. Psikrofilik ve termofilik olmakla birlikte çoğunlukla mezofilik yapıdadırlar (Ayhan 2000).

Endospor oluşturma yeteneğine sahip *Bacillus* 'lar, vejetatif hücrelerde 0,5×1,2 µm ile 2,5×10 µm çapındadır. *Bacillus* cinsi koloniler, morfolojik olarak çeşitlilik göstermekle birlikte genel olarak beyaz ve krem rengi kolonilere sahiptirler (Kalaylı ve Beyatlı 2003).

Bacillus 'ların bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi bir gelişim gösterirler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol ihtiva ederler. Nitrojen kaynağı olarak amonyum içeren sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Altun vd 2002).

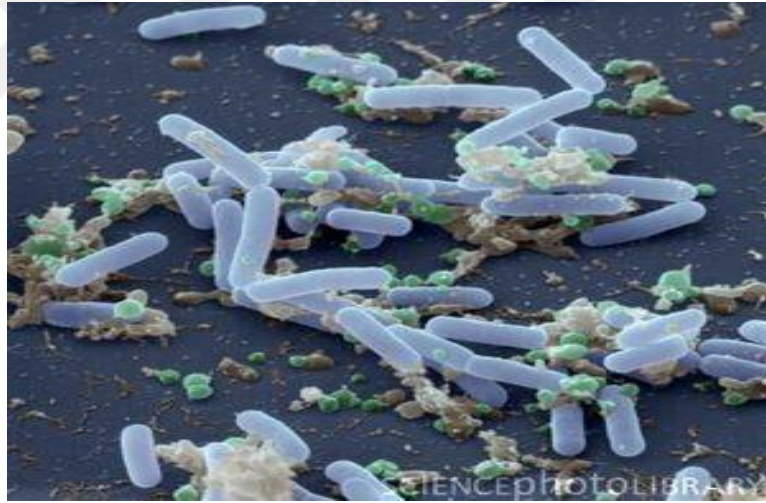
Bacillus türlerinden birkaçı polipeptid sınıfı antibiyotik üretebilmektedir. Kültürlerde spor oluşturma aşamasında, antibiyotiklerin oluştuğu belirlenmiştir (Kalaylı ve Beyatlı 2003).

1.5.3. *Bacillus pumilus* ve genel özellikleri

Yaygın olarak toprakta bulunan gram-pozitif, anaerobik, spor oluşturuucu bakterilerdir (Priest 1993).

Gıda, kimya, deterjan ve deri endüstrileri *B.pumilus*'un oluşturduğu proteazlardan yararlanır (Pan *et al.* 2004).

Koloni morfolojisi değişiklik gösterebilir. Buruşuk, düzensiz ve pigmentleşmiş koloniler olabilir. Suşların kolonileri Nutrient Agar'da pürüzsüz ve hafif sarımsı renktedir (Şekil 1.6). pH 5.7-9.5 aralığında büyüme gösterirler (Anonim 2017g).



Şekil 1.6. *Bacillus pumilus* bakterisi (Anonim 2017h)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bhushan and Hoondal (1999), *Bacillus* sp. BG-11'den saflaştırılmış, termostabil kitinaz aktivitesinin %90'ını Aromex, Captan, Captafol, Dinocap, Metalaxyl, Triadimefon, Acephate, Cypermethrin, Diclovorus, Chlorothalonil, Chloropyrifos, Dimethoate, fungusit, Malathion, Methomyl, Sulphur, Monocrotophos ve Methylparathion gibi mevcut insektisitte litrede 100 µg enzim konsantrasyonunda aktivitesini korumuştur. Allosamidin kitinazı IC50 ve 48 µM'da inhibe etmiştir.

Bhushan (2000), alkalofilik çevrede yaygın bulunabilen mikroorganizma olan *Bacillus* sp. BG-11 tanımlamış ve izole etmiştir. Bakteri kitince zenginleştirilmiş ortamda, 72 saat 50°C'de broth besiyeri fermantasyonunda 76 U ml ml-1 kitinaz üretmiştir. Saflaştırılan kitinin moleküler ağırlığı SDS-PAGE uygulamasıyla yaklaşık olarak 41 kDa olarak tespit etmiştir. İmmobilize kitinazın, kalsiyum alginatdaki ve kitozan optimum sıcaklığı 50°C ve optimum pH'sı 8,5'dir ve bu serbest enzimle aynıdır.

Ramirez *et al.* (2003), kitinaz aktivitesini arttırmayı amaçlayan, Remazol Brilliant Blue R® ile boyanmış kolloidal kitinin kullanımına bağlı olarak, kitinaz aktivitesini arttırmayı hedefleyen duyarlı ve basit bir yöntem kullanmışlardır. Bu teknikte, işaretlenmiş kolloidal kitin, broth besiyerinde karbon kaynağı olarak mevcutsa, kitinolitik mikroorganizmaların karşılaştırılmasını ve seleksiyonunu sağlamaktadır. Kolloidal substrat orantılı olarak çözünmüş ve boyayı serbest bırakmıştır. Spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Bu çalışmada RBB'nin kolloidal kitini fiksasyonu ve boyaması için kullanılan prosedürler ve ticari substratı chitin-azure ile karşılaştırması yapılmıştır. Boyaların serbest bırakılması sırasında ki bazı enzimatik ve fizikokimyasal parametrenin etkisi de ayrıca gösterilmiştir. Her iki boyanmış substrat konsantrasyonu, pH, zaman ve ısının *Bacillus thuringiensis* BT-107'deki kitinaz reaksiyonuna etkisini incelemek için kullanılmıştır.

Yuli *et al.* (2004), Endonezya'nın Tompaso sıcak su kaynağından bakteri izolasyonu yapmış ve 16S rRNA analizine göre bu bakterinin kitinaz üreten *Bacillus pumilus* olduğunu saptamışlardır. Bakteri %5'lik kitinli besiyerinde 72 saat 55°C'de üretildiğinde ekstrasellüler kitinaz olarak üretildiği gözlenmiştir. Üretilen bu enzimin pH 7.8 ve sıcaklık 60°C'de optimum aktivitesi tespit edilmiştir. 5 saat 70°C ön inkübasyondan sonra kitinaz aktivitesi korunmuştur. Zimogram analizleri ile de enzimin optimum sıcaklığı teyit edilmiştir. 1 saat 80°C'de inkübasyondan sonra enzim önemli derecede korunmuştur.

Lee *et al.* (2006), *Bacillus sp.* DAU101'e ait kitinaz genini *E.coli*'ye aktarmışlardır. Kitinazın optimum sıcaklığı 60°C ve optimum pH'sı 7,5 olarak saptanmıştır. Hg⁺², Zn⁺² ve Cu⁺² metal iyonları, kitinaz aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe etmiştir. Fakat kitinaz aktivitesi Co⁺² ile de 1,4 kat arttığını gözlemlemişlerdir. Enzim; glikol kitosan veya glikol kitin hidroliz edemediği halde çözülebilir kitosanı veya koloidal kitini hidrolize etmiştir.

Gurav *et al.* (2017), yaptıkları bu çalışmada kitin agarındaki hidroliz zonlarına bakarak kabuklu deniz ürünü endüstrisinde kullanılan topraktan *Bacillus pumilus*' un SUK25 ve RST25 suşları izole edilmiştir. Bu suşlar SUK25 ve RST25 sırasıyla 96 saatte (51.7 ± 0.8 Uml-1) ve 72 saat (59.4 ± 1.1 U ml-1) olmak üzere max. kitinaz aktivitesi üretmiştir. Her iki kitinazda sıcaklık 40°C, pH 7.0 ve %1.0 (w / v) en yüksek aktiviteleri göstermiştir. RST25 suşu 16S rRNA sekans analizi sonucu *Bacillus pumilus*'un en güçlü kitinaz üreticisi olarak saptanmıştır. *Aspergillus niger* ve *Fusarium solani*' ye karşı önemli ölçüde inhibe edici özellik sergilemiştir. Uygulama sonunda *B. pumilus* RST25 fungal fitopatojenlere karşı muhtemel bir biyokontrol maddesi olabileceği ortaya konmuştur.

Bhattacharya *et al.* (2017), yaptıkları çalışmada *Bacillus pumilus* JUBCH08'in kitlenin fermantasyonunu etkileyen enzimin karakterizasyonu, saflaştırılması, proses parametreleri ve bakterinin *Fusarium oxysporum*'a karşı antagonistik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Başlangıçta %0,5 kitin pH 8,0 ile desteklenmiş ortam 72

saat 35°C’de inkübe edildiğinde en yüksek kitinaz üretimi gözlenmiştir. Enzimin Vmax ve Km değerleri sırasıyla 38.23 U / ml ve 0.13 mg / ml’dir. Sonuç olarak *B. pumilus* JUBCH08’in kültürel koşulların kitinaz üretimini güçlü bir şekilde etkilediği alkali koşullar altında ve sıcaklığa karşı iyi işlev gören kitinaz enzimi ilgili biyoteknolojik uygulamalar ve yem sanayi için yararlı olabileceği söylenmiş ve *F.oxysporum* 'un kültür tarafından engellenmesinden dolayı bir biyokontrol maddesi olarak potansiyel göstermiştir.

Vahed *et al.* (2017), bu çalışmada azotlu asit tedavisi ve UV ışınlama kombinasyonu kullanılarak *Bacillus pumilus* SG2'nin mutajeni ile yüksek kitinolitik aktiviteye sahip AV2-9 olarak adlandırılan bir mutant elde edildi. Çalışmalar sonunda mutant suşta kitinazın termal stabilitesinin arttığı gözlenmiştir.

Wiwat *et al.* (1999), yaptıkları çalışmada *Bacillus circulans* suşunun geniş pH aralığında (6.0- 12.0) kitinaz ürettiğini ve bu kitinazı kodlayan genin *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*'ye aktarılırsa böceklerle yapılan biyolojik mücadelede ciddi toksisite artışına neden olabileceğini söylemişlerdir.

Mcclery and Matheson (1987) yaptığı çalışmada fermentasyon aracılığıyla *Bacillus pumilis*'ten ticari kitosanazlar (Chitosanase BP [MJ]) üretmişlerdir. Enzimin, glükozamin polimerlerini ihtiva eden mikroorganizmaların duvarını parçalayabildiğini saptamışlardır. Enzim için optimum sıcaklık ve pH aralığı sırasıyla 40-60°C ve 5-6.5 olarak belirlenmiştir.

Chang *et al.* (2007) yaptığı çalışmada *Bacillus cereus* 'un bitki büyümesini uyarıcı bileşiklerin, deniz atıklarından kitinin uygulamasıyla elde edildiği sonucuna varılmıştır.

Perrakis *et al.* (1994), tütün bitkisinde yeni keşfettikleri kitinazı, çinko affinite kolonu kullanarak saflaştırıp ve daha sonra klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Rishad *et al.* (2017) yaptığı çalışmada mangrov ekosistemlerinin ekstrem koşullarında kitinaz üreten bakteri kökenlerinin karakterizasyonu, izolasyonu ve biyokontrolünün araştırılmasını amaçlamışlardır. Araştırılan 51 izolattan 16S rDNA tipi ile tanılamalar yapmışlardır ve *Bacillus pumilus* 'un en yüksek kitinaz üretim potansiyeli olduğunu saptamışlardır. *B.pumilus* 'un saflaştırılan kitinaz enziminin *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporium* ve *Ceratorhiza hydrophila* gibi tarımsal patojenlere karşı antimikotik etkinlik gösterdiğini ifade etmişlerdir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, taze yağlı peynirden örnek alınmıştır. Bakteri izolasyonu için gereken genel ve özel besiyeri, bakterinin moleküler tanı ve enzim aktivitesi işlemlerinde kimyasallar ve kitler kullanılmıştır.

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar:

Vorteks (Wisemix Vm-10, KOREA)

İnkübatör (Wisecube, KOREA)

Otoklav (Wiseclave Wac-47, KOREA)

Mikroskop (Bresser, GERMANY)

Steril Kabin (Safefast Classic 212 359, SINGAPORE)

Manyetik Karıştırıcı (Heidolph, GERMANY)

pH Metre (Ohaus Starter3000, USA)

Hassas Terazı (Shimadzu, JAPAN)

Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE)

Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)

Derin Dondurucu (Nuaire -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)

Mikrodalga Fırın (Arçelik, TÜRKİYE)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Spektrofotometre (UV-1201V)

Santrifüj (Therma Mr23 İ, GERMANY)

Elektroforez Akım Sağlayıcı (Biometra Pack P25, GERMANY)

Jel Görüntüleme Sistemi (Biorad Gel Doc 2000, ITALY)

Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)

PCR Cihazı (Thermo Cycler Block, GERMANY)

Çalkalayıcı (Shimadzu, PHILIPPINES)

DNA İzolasyon Robotu (Qiacube, GERMANY)

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Nutrient Agar (Oxoid), Nutrient Broth (Merck), Proteinaz K (Merck), Tris - HCl (Merck), NaCl (Merck), Ethanol (Merck), 1XTAE (Sigma), 1XTBE (Sigma), 20X Dimetil sülfoksit (Sigma), 10 x PCR tamponu: (Sigma), Jel Red (Sigma), dNTPs (Sigma), *Taq* DNA polimeraz (Sigma), Agaroz (Sigma).

3.1.3. Kullanılan kitler

Bakteri DNA izolasyonu kiti (QIAGEN).

3.1.4. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

Nutrient Agar: Hassas terazide tartılan 28g/L Nutrient Agar karışımı hazır haldeki 1 L dH₂O içerisine ilave edilerek elde edilen besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dk steril hale getirilip soğumaya bırakılmıştır. Besiyeri 45°C'ye varıncaya kadar soğutulduktan sonra steril halde bulunan petrilere dağıtılarak katılaşması için bekletilmiştir (Lelliot and Stead 1987).

Nutrient Broth: 1 L dH₂O içerisine 8g Nutrient Broth hassas terazide tartılarak eklenmiştir. Daha sonra otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilerek kullanılmıştır (Anonim 2017h).

Stok Besiyeri: 0,65g nutrient broth karışımına 36 ml gliserol ilave edildikten sonra toplam hacim 100 ml olacak şekilde saf su ilave edildi. Tam çözünme olması için

manyetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri otoklavda steril edildi. Aseptik olarak 2 ml'lik steril eppendorf tüplere 1,2 ml konularak hazırlandı (Saygılı vd 2006).

Proteinaz K: İzolasyon kiti içerisinde hazır bir şekilde gelen proteinaz K'dan 200 µl alınarak steril eppendorf tüplere aktarıldı. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında bekletildi.

1XTAE Tamponu: 100 ml 10XTAE'nin (Sigma) hacmi sdH₂O ile 1000 mL oluncaya kadar tamamlandı.

1XTBE Tamponu: 100 ml 10XTBE'nin (Sigma) hacmi sdH₂O ile 1000 mL oluncaya kadar tamamlandı.

% 70'lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün üzerine hacmi 100 ml oluncaya kadar saf su eklendi. -20°C'de muhafaza edildi.

20X Dimetil sülfoksit (DMSO): 2ml'lik steril eppendorf tüplere alınan, %100'lük DMSO (Sigma) kullanılıncaya kadar 25°C'de bekletildi.

6X yükleme tamponu: 100 ml yükleme tamponu için % 100'lük gliserolden (Sigma-G9012) 40 ml alınarak, 0,1 g bromfenol blue (Sigma) ile karıştırıldı ve hacmi 1x TAE 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon amber şişe içerisinde güneş alması engellenerek, +4°C'de korundu.

10 x PCR tamponu: (Sigma) (100 mM Tris – HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ , %0,01 jelatin pH: 8,3) *Taq* DNA polimeraz ile birlikte gelmektedir.

Primerler: 27F - 1492R primer seti MgCl₂ (Sigma-M1028): 1M olan hazır çözelti 25 mM olacak şekilde steril saf su ile sulandırıldı.

dNTPs (Sigma): (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10 mM)
-20°C’de muhafaza edildi.

Agaroz (Sigma-A5093)

DNA markır (Sigma): 1 kb’lık DNA marker.

Taq DNA polimeraz (Sigma)

Primer Çalışma Konsantrasyonu: Ticari olarak liyofilize halde alınan primerler kullanma kılavuzunda yazılan protokol doğrultusunda çözülerek ($C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$) formülü uygulanarak son konsantrasyonu 50 μ M olacak şekilde hazırlandı.

Enzim Aktivitesi İçin Kullanılan Çözeltiler

Substratın Hazırlanışı

Substrat 0,02 M Sodyum sitrat çözeltisine %0,05’lik kitin ilave edilerek hazırlanmıştır.

Çözelti içerisinde yer alan 0,02 M Sodyum sitrat tamponu ise; 5,88 g Sodyum sitrat tartılıp, distile su ile 100 mL’ye tamamlandıktan sonra pH 6.0’a ayarlanarak hazırlanmıştır.

Renklendirme Çözeltisinin Hazırlanışı

0,01 M DNSA çözeltisi için 3,5-dinitrosalisilik asit distile saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Optimum pH Aktivitesi İçin Kullanılan Tamponlar

a. Sodyum asetat tamponu

pH 2.0-3.0 aralığındaki kitinaz aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. 0,82 g sodyum asetat 0,1 M asetat tamponu için tartılmış ve dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. İstenen pH değerlerini saptamak için 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl kullanılmıştır.

b.Sodyum sitrat tamponu

pH 4.0-6.0 aralığındaki kitinaz aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. Tampon 0.1 M olacak şekilde 2.8 g sodyum sitrat tartılıp dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. İstenen pH değerlerini saptayabilmek için 0,1 M'lık HCl ve/veya NaOH kullanılmıştır.

b. Tris-HCl Tamponu

pH 7.0-9.0 Aralığındaki kitinazın aktivitesini belirlenmesi için kullanılmıştır. 0,121 g Trizma base 10 mM Tris-HCl tamponu için tartılmış ve 100 ml suda çözünerek hazırlanmıştır. Uygun pH değerini elde etmek üzere konsantre NaOH ve/veya HCl özeltisi kullanılmıştır.

c. Karbonat Tamponu

pH 10.0-11.0 Aralığındaki kitinazın aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. 0,105 g sodyum karbonat 10 mM Karbonat tamponu için tartılmış ve 100 ml distile su ile üzeri tamamlanmıştır. Uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizma izolasyonu ve identifikasyonu

Yağlı peynir örneğinden 10 g tartılıp 100 ml serum fizyolojik tuzlu su içerisinde vorteks ile homojenize edilmiştir. Dilüsyon işlemi ile örnekten 1'er ml alınarak içerisinde 9 ml fizyolojik tuzlu su bulunan cam tüplere aktarım yapılmıştır. Vorteksleme işlemi yapıldıktan sonra 10^4 - 10^{-6} 'dan 0,1 ml alınarak bakterinin nutrient agara yayma yöntemi ile aktarımı gerçekleştirilmiştir. 30-33°C'de 24-48 saat boyunca inkübe edildikten sonra tek kolonilerden çizim usulü ekim yapılarak bakteri saflaştırılmıştır.

3.2.2. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi

Bakterilerin morfolojileri boyutları çok küçük olduklarından dolayı bireysel yapıları sadece mikroskoplarla belirlenebilir. Bu nedenle, katı ya da sıvı besiyerlerinde saf bir şekilde geliştirilen hazırlanmış bakteri preparatları spesifik boyalar aracılığıyla işlem yapılarak inceleme yapılır. Mikroskoptaki incelemelerde, bakterilerin boyutları, spor durumu, boyanma özelliği (Gram (-) veya (+), vb.) gibi özelliklerinin varlığı incelenir (Arda 2000; Harley and Prescott 2002).

a. Hücre Morfolojisinin Belirlenmesi: Her bir izolattan örnek hazırlanarak kristal violet ile basit boyama yapılmış ve mikroskop altında görüntülerine bakılarak sonuçlar elde edilmiştir (Temiz 2000; Harley and Prescott 2002).

Bakteri izolatlarının hücre duvarlarındaki farklılığın belirlenmesi için gram boyama testi yapılmıştır (Tarakçıoğlu 2016). Bu testte aşağıdaki yöntem kullanılmıştır.

- a) Lam üzerine bir damla saf su aktarılır ve daha sonra üzerine besiyerinde 24 saat geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu alınarak iyice yayılır.
- b) Ateşten geçirilerek fikse edilir.

- c) İlk olarak kristal viyoleto boyası ile 1 dk muamele edilir ve saf su ile 30 sn yıkanır.
- d) Lügol ile 1 dk muamele edilir ve % 96'lık etil alkol ile yıkanır.
- e) Tekrar saf sudan geçirilerek son kez safranın boyası uygulanır.
- f) Preparat yıkanıp kurutulur.
- g) Mikroskop altında incelenir.

3.2.3. Çalışmada kullanılan bakteri kültürlerinin muhafazası

Her bakterinin 24 saatlik saf kültüründen bir lop alınarak, içerisinde 500 µl LB Broth (1 L dH₂O'ya 10 g tryptone, 10 g NaCl ve 5 g yeast extract ilave edilerek hazırlanacaktır.) ve 500 µl %30'luk gliserol bulunan eppendorf tüplere aktararak etiketlenir. Vorteks cihazında vortekslenerek -80°C'de sonraki çalışmalar için muhafaza edilir.

3.2.4. Mikroorganizmanın moleküler tanılanması

3.2.4.a. Bakteri izolatlarının DNA izolasyonu

İzolatların DNA'ları bakteri DNA izolasyon kiti (Qiagen'den uyarlanan protokol) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu aşamalar;

- a) Nutrient agarlarda geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu toplanarak steril eppendorf tüplerine alındı.
- b) Toplanan tüplere 200µl Lizozim + TrisHCL çözeltisi eklendi.
- c) Bu karışım güzelce vorteks edilerek homojen bir çözünme olması sağlandı.
- d) Vorteks'lenen karışımlar 45 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bu sürede her 15 dakikada bir vorteks yapıldı.
- e) İnkübasyon sonunda örnekler 12000rpm'de 5 dakika 24°C'de santrifüj edildi.
- f) Santrifüjlenen örnekler sıvı kısmı dökülerek cidara yapışan pelet kısım bırakıldı.

g) Örnekler robotun bölümlerine dizilerek izolasyon başlatıldı.

0,6 g agaroz, 1XTBE tamponuna aktarıldı. Mikrodalgada elde edilen karışım şeffaf bir görünüm alıncaya kadar kaynatıldı. El yakmayacak kadar soğutulan agaroz jeli 0,6 µl red kimyasalı eklenerek, içerisine tarakların yerleştirildiği elektroforez jel küvetine döküldü. 15-20 dk sonra jelden taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı. 1XTBE tamponu jel yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde tankın içine yerleştirildi. Marker ve DNA yüklemesi yapıldıktan sonra %1'lik konsantrasyona sahip agaroz jelde DNA yürütüldü.

3.2.4.b. 16S rRNA bölgesinin PCR yardımı ile çoğaltılması

Bakterilerin sistematiği açısından önemli bir yere sahip olan 16S rRNA'nın sentezlendiği bölge seçilmiş ve evrensel primerler (27F forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'; 1492R reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3') kullanılarak laboratuvar ortamında çoğaltılmıştır.

PCR reaksiyonun hazırlanması: 30 µl'lik reaksiyonda; aşağıdaki karışım hazırlanmıştır.

- a) 10 x PCR tamponu
- b) dNTPs
- c) Forward primer
- d) Reverse primer
- e) MgCl₂
- f) Taq DNA polimeraz
- g) DMSO
- h) Steril Saf Su

Son olarak karışıma 1 µl kalıp DNA ilave edilerek son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır (Barış 2009).

PCR programı: PCR reaksiyonu hazırlanan örnek materyal ile aşağıdaki safhalar olacak şekilde bir programda çalışılmıştır.

- a) 95°C’de 120 saniye denatürasyon sonrasında
- b) 53°C’de 60 saniye bağlanma
- c) 72°C’de 5 dakika uzama (Barış 2009).

16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi: 1,8 gr agaroz üzerine 120 ml 1XTAE tamponu eklendi. Mikrodalga fırınında elde edilen karışım şeffaf bir görünüm alınca kadar kaynatıldı. 50°C’ye veya el yakmayacak kadar soğutulan agaroz jele 0,6 µl jel red kimyasalı eklenerek, içerisine tarakların yerleştirildiği elektroforez jel küvetine döküldü. Belli bir süre beklenerek donduğu anlaşılan jelden taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı. 1XTAE tamponu jel yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk kuyucuğa, DNA markerından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D7058) 8 µl yüklendi. Diğer kuyucuğa örnek yüklendi. PCR örneği % 1,5’lik agaroz jelde yürütüldü.

Elektroforez jel düzeneği; 90 volt akımda 60 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, UV ışık sistemi altında görüntülendi ve bilgisayar ortamında analiz edildi (Barış 2009).

3.2.4.c. DNA dizi analizlerinin alınması ve sonuçların değerlendirilmesi

Sekans analizi sonuçları BioEdit ile analiz edilerek Fasta formatına çevrildi. Primerler bulunup ve öncesindeki kısımlar çıkarıldı. Daha sonra aradaki her iki taraftan okunan kısım kontrol edilerek düzenlendi NCBI veri bankasında sekans sonuçları karşılaştırıldı.

3.2.5. Bakterilerin inokülasyonu

Nutrient Agar'da gelişme gösteren bakteriler, Nutrient Broth'a inoküle edilerek bakterilerin sıvı kültür ortamına aktarılması sağlanmıştır. 30 -33°C'de 120 saat etüvde inkübasyona bırakılacaktır.

3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Kitinaz aktivitesi ölçülürken her basamakta elde edilen süpernatantların hepsinden aktivite tayini yapılmıştır. Kitinaz enziminin aktiviteye sahip olduğu aralıklar tespit belirlenmiştir. Aktivite tayini hesaplanırken 200 µL enzim çözeltisi üzerine 500 µL substrat eklendikten sonra vorteks ile karıştırılmış daha sonra 30 dakika 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda reaksiyona sokulmuştur. Su banyosundan alınan tüplere 750 µL renklendirme çözeltisi eklenmiş ve 10 dakika 80°C'de su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra su banyosundan çıkarılan her bir örneğe 1300 µL saf su eklendikten sonra 3200 devir/dakika 10 dakika santrifüj edilmiştir. 540 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapılarak aktivite tayini tamamlanmıştır.

3.2.6.a. Enzimin optimum pH değerinin saptanması

Elde edilen kitinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için asetat (pH 2.0-3.0), sodyum sitrat (pH 4.0-6.0), Tris (pH 7.0-9.0) ve karbonat (pH 10.0-11.0) tampon çözeltileri kullanılmıştır. Farklı pH değerlerinde olan (pH 2.0-11.0) ve içerisinde %0,05 kitin bulunan substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Aktivite tayini yapmak için 200 µL enzim ve 500 µL substrat 2 ml'lik tüpte vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dakika reaksiyona girmesi beklenmiştir. Su banyosundan alınan tüplere 750 µL renklendirme çözeltisi ilave edildikten sonra tekrar 80°C'de 10 dakika beklenmiştir. Daha sonra her bir örneğe 1300 µL saf su ilave edilerek 3200 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj yapıldıktan sonra örnekler kör'e karşı 540 nm'de spektrofotometrede ölçümü yapılmıştır.

3.2.6.b. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C'lik sıcaklıklar seçilmiştir. Sıcaklık ölçümlerinin saptanması için su banyosu kullanılmıştır. Aktivite tayininin yapılabilmesi için 200 µL enzim ve 500 µL substrat karıştırılarak standart aktivite ölçümü yapılmıştır.



4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR

4.1. Kültür zelliklerinin Belirlenmesi

Bacillus pumilus cinsi bakterinin kültürel özelliklerini belirlemede, katı (Nutrient Agar) besiyeri kullanılarak ve her bir izolatın olgun koloni oluşturduğu süre zarfında belirli aralıklarla sonuçlar alınmıştır. Koloni görüntüsü Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Kültüre alınan bakteri ze yardımıyla çizgi ekim yöntemi ile çizimi gerçekleştirilmiştir. Besiyerin de oluşan bakterilerde saf koloni yapıları incelenmiŐ ve yapılan çalıŐmaya eldeki saf koloniler ile devam edilmiştir.

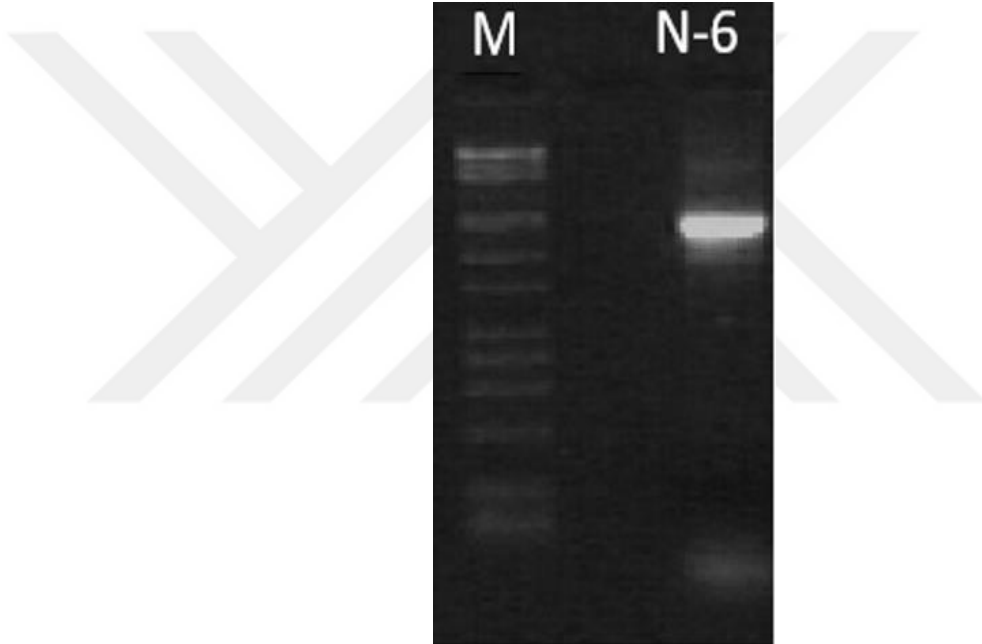


Şekil 4.1. *Bacillus pumilus* bakterisinin koloni görünümü

4.2. Moleküler Yöntem ile *Bacillus pumilus*'un Tanınması

4.2.1. DNA izolasyon sonucu

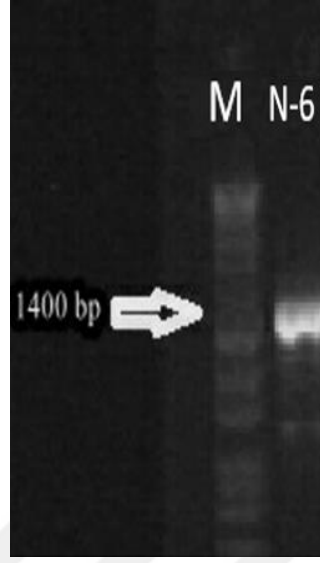
Saflaştırılması yapılmış olan *Bacillus pumilus*'un DNA izolasyonu yukarıda belirtilmiş olan bölüm 3.2.4'de belirtilmiş olan protokol doğrultusunda uygulanmıştır. İzolasyon sonucu Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. *Bacillus pumilus* (N-6)'a ait elektroforez görüntüsü

4.2.2. PCR sonuçlarının jel görüntüsü

Bacillus pumilus'a ait olan genomik DNA'lar kullanılarak PCR reaksiyonları aşamasında beklenen baz büyüklüğü 1400-1500 bp olarak belirlenmiştir. Belirtilen görüntü Şekil 4.3'te gösterilmiş ve işaretlenmiş bölge 1400 bp büyüklüğündedir.



Şekil 4.3. *Bacillus pumilus* (N-6)'un PCR Reaksiyonu Sunucu Jel görüntüsü

4.2.3. Dizi analizi sonuçları

PCR aşaması sonucunda 16S rRNA ge bölgesinin tespitini sağlamak amacıyla sekanslama (Dizi Analizi) amacıyla örnekler göndermiştir. Gelen veriler doğrultusunda yapılan blastlama işlemi sonucu 16S rRNA dizileri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

- Dizi analizi sonucu *Bacillus pumilus*'un referans numarası KU230004.1 olarak belirlenmiştir.

4.3. Kitinaz aktivitesi sonuçları

Bacillus pumilus'un spektrofotometrede ölçülen absorbans değeri 0,06 olarak ölçülmüştür. Optimum sıcaklık ve pH değerlerinde farklı aktiviteler ölçülmüştür.

4.3.1. Kitinaz enziminin optimum pH sonuçları

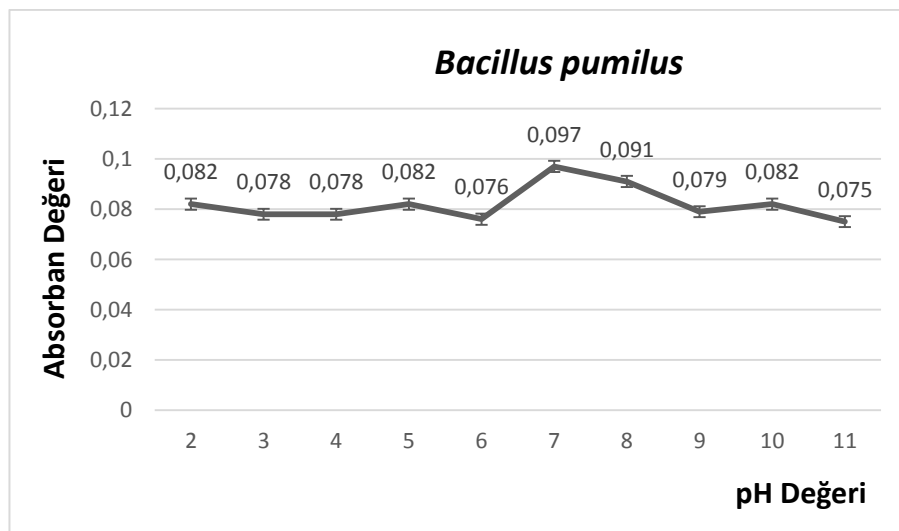
Bacillus pumilus'dan üretilip saflaştırılan kitinaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için 3 kez ölçüm yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Optimum pH 2,0-

11,0 aralığında on farklı ortamda çalışılmıştır. pH 2,0-6,0 arası asetat, pH 7,0-9,0 arası Tris / HCl ve pH 10,0-11,0 arasında karbonat tamponları kullanılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda aktivitesi hesaplanmış ve ‘‘pH-Aktivite’’ grafikleri çizilmiştir. Excel programı ile tablosu yapılmıştır (Şekil 4.4).

Bacillus pumilus’un optimum pH absorbans değeri pH 7 dir.

Çizelge 4.1. *Bacillus pumilus*’un optimum pH absorbans (A) değerleri

pH	1.DENEME (A)	2.DENEME (A)	3.DENEME (A)	ORTALAMA (A)
2	0,052	0,099	0,095	0,082
3	0,07	0,079	0,085	0,078
4	0,068	0,086	0,08	0,078
5	0,072	0,083	0,092	0,082
6	0,063	0,078	0,087	0,076
7	0,093	0,098	0,101	0,097
8	0,086	0,09	0,099	0,091
9	0,072	0,084	0,081	0,079
10	0,08	0,086	0,081	0,082
11	0,078	0,065	0,083	0,075



Şekil 4.4. *Bacillus pumilus*’tan elde edilen ekstraselüler kitinaz enziminin aktivitesi üzerine pH’nın etkisi

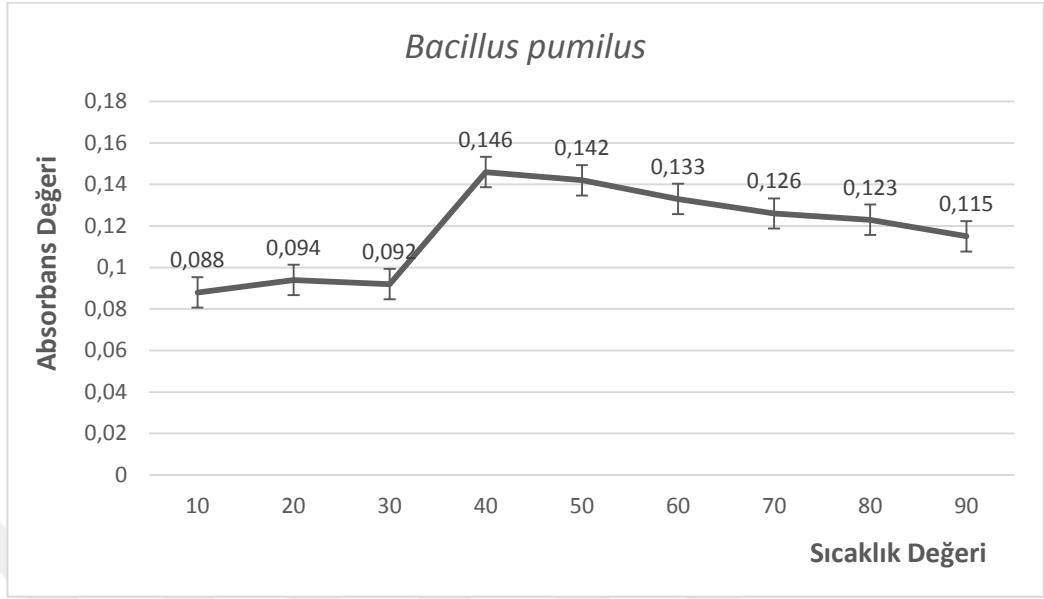
4.3.2. Kitinaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

Bacillus pumilus'tan elde edilip saflaştırılan kitinaz enzimi optimum sıcaklıklarını tespit etmek için gerekli ölçümler yapılmıştır (Çizelge 4.2). Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplanmış ve “Aktivite-°C” grafikleri çizilmiştir. Elde edilen bulgulara göre *Bacillus pumilus*'a ait fitaz enziminin optimum sıcaklığı 40°C olarak bulunmuştur. *Bacillus pumilus*'dan elde edilen fitaz enzimi optimum sıcaklık sonuçları Excel programı ile yapılmış olup, sonuçlar Şekil 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Bacillus pumilus* ‘un optimum sıcaklık absorbans (A) değerleri

SICAKLIK	1.DENEME (A)	2.DENEME (A)	3.DENEME (A)	ORTALAMA (A)
10	0,078	0,092	0,095	0,088
20	0,092	0,093	0,097	0,094
30	0,087	0,095	0,095	0,092
40	0,187	0,151	0,101	0,146
50	0,18	0,149	0,098	0,142
60	0,18	0,135	0,086	0,133
70	0,163	0,132	0,083	0,126
80	0,156	0,132	0,081	0,123
90	0,134	0,129	0,082	0,115

Bacillus pumilus ‘un optimum sıcaklık absorbans değeri 40°C dir.



Şekil 4.5. *Bacillus pumilus*'tan elde edilen ekstraselüler kitinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji laboratuvarları kullanılarak izolasyon yapılmış, kültür koleksiyonuna 20 bakteri kazandırılmıştır. Bakterilerin izolasyonu için örnek olarak yağlı peynir kullanılmıştır. Örneklerden dilisyonlar hazırlanarak seyreltme işlemi yapılmıştır. Nutrient agara yayma plak yöntemi ile çalışılmıştır. 30-33°C 24 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerine çizim metodu kullanılarak ekim yapılmıştır. Saflaştırma işlemleri farklı tüm koloniler için devam etmiştir. Tanılama 20 örnek arasında olmuştur. Sekans sonucu tanılanan *Bacillus pumilus* seçilerek projemizde kullanılmıştır.

Bacillus pumilus 0.6-0.7 mm genişlik ve 2-3 mm uzunluğunda çubuksu ve Gram pozitif bir bakteri olduğu gözlenmiştir. Bu bakterilerin iki önemli ayırt edici özelliği bulunmaktadır. Bunlar;

1. Nutrient Agar da çoğu türlerin kolonisinin düz (pürüzsüz) bir yapı sergilemesi,
2. Hafifçe sarı olması ve bazı türlerin aşırı aminoasit ile birlikte biotine ihtiyaç duymasıştır. Yuli *et al.* (2004) çalışmalarında *Bacillus sp.*'leri Gram (+), spor üreten, çubuk şekilli bakteri olarak saptamıştır.

Yaptığımız çalışmada *Bacillus pumilus*'un moleküler tanılmasında öncelikli olarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon işlemi QIAGEN bakteri izolasyon kiti ve protokolü uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Evrensel primerler yardımıyla PCR protokolü uygulanarak istenilen bölgeler çoğaltılmış ve bakterinin sistematığı açısından önemli olan 16S rRNA'nın sentezlendiği bölgeler seçilmiştir. Barış (2009) ise yaptığı çalışmada bakterilerden DNA izolasyonu yaparken Wilson'un protokolüne uymuş ve izolasyonu manuel olarak yapmıştır. Büyükyörük ve Soyutemiz (2010) bakteriden DNA izolasyonu yaparken DNA ayırma kiti (Fermentas, FE-K0512) protokolüne göre

izolasyonu yaparak farklı bir yol izlemiştir. Denemelerimizde kit olarak QIAGEN bakteri izolasyon kiti ile DNA robotu kullanılarak izolasyon yapılmıştır.

Bacillus pumilus'un ürettiği kitinaz enziminin optimum pH'sı 7.0 olarak tarafımızdan belirlenmiştir. Genellikle diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Bhushan (2000) yaptığı çalışmada *Bacillus sp.* 'nin ürettiği kitinaz enziminin optimum pH'sını 8.5 olarak bulmuştur. Yuli *et al.* (2004), çalışmalarında *Bacillus sp.*'nin kitinazın optimum pH'sını 7.8 olarak bulurken benzer şekilde Gurav *et al.* (2017) optimum pH'yı 7.0 olarak bulmuştur.

Kuzu (2008) çalışmasında HBK-51 suşu kitinli (%1 kolloidal kitin) besiyerinde üretmiş ve süpernatant filtre edildikten sonra, farklı pH değerlerinde standart enzim aktivite denemesine tabi tutmuştur. Enzimin aktivite gösterdiği optimum pH'ın ise 9.0 olan alkali bir enzim olduğunu göstermiştir. Ohishi (1996) ve Ueda ve Arai (1992) mikrobiyal kitinazların yüksek pH aralıklarında aktivite gösterdiğini söylemişlerdir. Lee *et al.* (2006), *Bacillus sp.* DAU101'in kitinaz genini *E.coli*'ye aktarmışlardır. Kitinazın optimum pH'sı 7.5 olarak saptanmış olup bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Hg⁺², Cu⁺² ve Zn⁺² metal iyonları, kitinaz aktivitesini kuvvetli biçimde inhibe etmiştir. Co⁺² ile de 1.4 kat artmıştır.

Frankowski *et al.* (2001), bir N-asetil-β-1,4-D-heksozaminidaz (E.C. 3.2.1.52), CHIT100 ve bir endokitinaz (E.C.3.2.1.14), CHIT60 saflaştırılmıştır ve tanımlanmıştır. 60.5 kDa ağırlıklı endokitinaz CHIT60 bir N-terminal aminoasit sekansına sahiptir ve buda *Serratia marcescens* ve *Serretia liquefaciens*'den elde edilenlere benzerlik gösterir. Enzim aktivitesi pH 5.4'de, 55 °C de pik yapmıştır. Optimal aktivitesi pH 6.6'da 43°C'dedir.

Bhushan (2000), çevrede yaygın bulunabilen, bir alkalofilik mikroorganizma olan *Bacillus sp.* BG-11 izole etmiş ve tanımlamıştır. Bakteri kitince zenginleştirilmiş ortamda, 72 saat 50°C de, sıvı batch fermantasyonda 76 U ml ml-1 kitinaz üretmiştir. Optimum sıcaklığı 50°C ve optimum pH'sı 8,5'dır ve bu serbest enzimle aynıdır.

Ramirez *et al.* (2003), kitinaz aktivitesini arttırmayı amaçlayan, Remazol Brilliant Blue R® ile boyanmış kolloidal kitinin kullanımına bağlı, kitinaz aktivitesini arttırmayı amaçlayan duyarlı ve basit bir metod kullanmışlardır. Her iki boyanmış substrat konsantrasyonu, substratta pH, zaman ve ısının *Bacillus thuringiensis* BT-107'deki kitinaz reaksiyonuna etkisini incelemek için kullanılmıştır. Bu teknikte, işaretlenmiş kolloidal kitin, sıvı besiyerinde karbon kaynağı olarak bulunuyorsa, kitinolitik mikroorganizmaların seleksiyonunu ve karşılaştırılmasını sağlamaktadır.

Bhattacharya *et al.* (2017) yaptıkları çalışmada *Bacillus pumilus* JUBCH08'in kitlenin fermantasyonunu etkileyen enzimin karakterizasyonu, saflaştırılması, proses parametreleri ve bakterinin *Fusarium oxysporum*'a karşı antagonistik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Başlangıçta % 0,5 kitin pH 8.0 ile desteklenmiş ortam 72 saat 35°C de inkübe edildiğinde en yüksek kitinaz üretimi gözlenmiştir. Enzimin Vmax ve Km değerleri sırasıyla 38.23 U / ml ve 0.13 mg / ml'dir. Sonuç olarak *B. pumilus* JUBCH08'in kültürel koşulların kitinaz üretimini güçlü bir şekilde etkilediği alkali koşullar altında ve sıcaklığa karşı iyi işlev gören kitinaz enzimi ilgili biyoteknolojik uygulamalar ve yem sanayi için yararlı olabileceği söylenmiştir.

Çalışmamızda *Bacillus pumilus* 'un ekstraselüler olarak ürettiği kitinaz enziminin optimum sıcaklığı 40°C olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesi 40°C'de, pH 7.0'de pik yapmıştır. Bugüne kadar kitinaz enziminin optimum sıcaklığı hakkında birçok çalışma yapılmıştır. Bhushan (2000) yaptığımız çalışmadan farklı olarak *Bacillus sp.*'lerin optimum sıcaklığının 50°C olduğunu söylerken; Yuli *et al.* (2004) *Bacillus sp.*'ler için optimum sıcaklığın 60°C olduğunu ve benzer şekilde Lee *et al.* (2006)'da 60°C olduğunu söylemişlerdir. Gurav *et al.* (2017) çalışmalarında *Bacillus pumilus* 'un ekstraselüler kitinaz enziminin optimum sıcaklığının 40°C olduğunu ifade etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada da benzer sonuç bulunmuş ve *Bacillus pumilus*'un güçlü bir kitinaz enzimi üreticisi olduğunu tespit ederek tezimizi desteklemektedir. Vahed *et al.* (2017) de yaptıkları çalışmada UV ışınlama kombinasyonu kullanılarak kitinazın termal stabilitesinin arttırılabileceğini göstermiştir.

Wiwat *et al.* (1999) *Bacillus circulans* 'ın optimum kitinazını 40°C, Kuzu (2008) HBK-51 suşu kitinli (%1 kolloidal kitin) besiyerinde üretilmiş enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın 110°C olduğu tespit edilmiştir. Bhushan ve Hoondal (1998) *Bacillus* 'ların kitinazlarının 44-55°C optimum aktivite gösterdiklerini söylemişlerdir.

Kitinaz enzimini üreten mikroorganizma suşlarının doğal kaynaklardan izole edilmesini endüstriyel boyutta incelediğimizde;

a-pH'nin nötr durumda olması teknolojik çalışmalarda özen gösterilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Substrat oluşumunda bu uygulamanın dikkate alınması gerekmektedir. Ayrıca kitinaz enzimimizin optimum sıcaklık aktivitesinin de yükseltilmesi gerekebilir. Bu türden çalışmalar yapılmış olup (Vahed *et al.* (2017) biyoteknolojik olarak *B.pumilus* bu uygulamaya uygun bir bakteridir. Ancak doğal kaynaklardan izolasyonu ve GRAS listesinde olmasından dolayı çeşitli endüstriyel uygulamalarda (gıda, ilaç vs.) kabul görmesi açısından bakterimizin önemi büyüktür.

b-Yüksek düzeyde enzimatik aktiviteye sahip türlerin seleksiyonu ve buna bağlı olarak insektisidal aktivitenin tespiti ile özellikle kitin bakımından zengin atıkların biyolojik olarak parçalanması önemli bir ekolojik kazanç sağlayacaktır. Bhattacharya *et al.* (2017) gibi bilim adamlarının yaptıkları çalışmalarla teyit edilen biopestisid olma yönü de bu bakterinin açıktır. Bioinsektisit (Wiwat *et al.* (1999); Bhushan and Hoondal (1999)) ve biofungisit (Gurav *et al.* (2017); Rishad *et al.* (2017)) şeklinde, biyolojik kontrol ajanları olarak da yararlanılabilecektir. Yüksek kitinaz aktivitesi gösteren mikroorganizma türlerinin identifikasyonu ve seleksiyonu gerçekleştirildiği takdirde, bu mikroorganizmaların enzim üreticileri olarak kullanılmaları veya atık materyallerden biomass üreticisi olarak yararlanılmalarına olanak sağlayacaktır. Kimyasal olarak hazırlanmış ve satışa sunulmuş, halen kullanılmakta olan pek çok insektisidin hayvan ve insan sağlığı üzerinde yaratmış olduğu birtakım sağlık problemleri kısmen çözümlenebilecek, özellikle kanserojenik ve teratojenik özellik taşımayan biopestisidlerin üretilebilmesi sağlanabilecektir.

c-Özellikle tıpta, mantar enfeksiyonlarında, sağlık için hiç bir toksik etkisi olmayan topikal kullanıma uygun anti-fungal preparatların üretilmesinde mikrobiyal kaynaklı kitinaz kullanımı sağlanmış olacaktır.

Kitinaz enziminin, alkali koşullara ve sıcaklığa karşı güçlü bir şekilde işlev görebildiğinden dolayı biyoteknolojik uygulamalar ve yem sanayi için yararlı olabileceği ve bu bakterinin bu enzimi endüstriyel koşullarda çok güçlü bir şekilde üretilbileceği ve bioreaktörlerde kullanıma açılacağı düşünülmektedir. Toksisitesi olmayan bu bakteriden üretilmesi sanayide (gıda vs.) geniş kullanım alanları da bulabilecektir. Kolay ve hızlı üretilmesi nedeniyle de tercih sebebi olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Açikel, Y. Ş., Çelebi, B., 2006. R. Delemar ile Lipaz Üretimi. Tübitak Projesi, MISAG-282.
- Adams, D. J., 2004. "Fungal cell walls chitinases and glucanases", *Microbiol.*, 150: 2029- 2035
- Aloise, P. A., Lumme, M., Haynes, C. A., 1996, "N-acetyl-d-glucosamine production from chitin-waste using chitinases from *Serratia marcescens*. In: Muzzarelli R.A.A., editor. *Chitin Enzymology, Vol.2*", Grottammare: Eur. Chitin Soc., p. 581-594.
- Altun, B., Besler, T., & Ünal, S. (2002). Ankara'da satılan sütlerin değerlendirilmesi. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 11(2), 45-55.
- Anonim 2017b (<http://gmbe.mam.tubitak.gov.tr/tr/arastirma-alanlari/enzim-ve-mikrobiyal-biyoteknolojisi>, (28.12.2017)
- Anonim 2017d. <http://www.biyodoc.com/enzim/2.PNG>. (28.12.2017)
- Anonim 2017e. <http://evrenbilgisi.blogspot.com.tr/2013/01/enzimler-veozellikleri.html>. (28.12.2017)
- Anonim 2017g. <http://www.tgw1916.net/Bacillus/pumilus.html>. 28.12.2017
- Anonim, 2017a. <http://gmbe.mam.tubitak.gov.tr/tr/arastirma-alanlari/enzim-ve-mikrobiyal-biyoteknolojisi> .(28.12.2017)
- Anonim, 2017c. <http://www.biyolojidersnotlari.com/biyoloji-canlilarin-temel-bilesenleriorganik-bilesikler.html>. (28.12.2017)
- Anonim, 2017f. https://www.google.com.tr/search?q=kitinaz%C4%B1n+%C3%BC%C3%A7+boyutlu+yap%C4%B1s%C4%B1&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjTzOaQ4onZAhVJy6QKHbg_A50Q_AUICigB&biw=1242&bih=588#imgrc=92mKTWR1T9dXhM
- Anonim, 2017h. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAA6AA849816B2EFC2619C8A57EBA6C1>. (28.12.2017)
- Anonim, 2017h. https://www.google.com.tr/search?dcr=0&tbm=isch&q=bacillus+pumilus&chips=q:bacillus+pumilus,online_chips:colony+morphology&sa=X&ved=0ahUKEwjKq5OZ-pvZAhUCVywKHTU1BvYQ4lYIKCgB&biw=619&bih=570&dpr=1.1#imgrc=h6IxdhY7h7UmWM (28.12.2017)
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46, 548s.
- Ayhan. K., 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını 43- 44 Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.
- Barış, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatışı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu Ve Tanısı. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Atatürk Üniversitesi.
- Bhat, M. K., 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5): 355-383.
- Bhattacharya, S., Das, A., Samadder, S., & Rajan, S. S., 2016. Biosynthesis and characterization of a thermostable, alkali-tolerant chitinase from *Bacillus*

- pumilus JUBCH08 displaying antagonism against phytopathogenic *Fusariumoxysporum*. 3 Biotech, 6(1), 87.
- Bhushan, B., 2000. Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5): 453-459.
- Bhushan, B. and Hoondal, G. S. 1999. Effect of Fungicides, Insecticides and Allosamidin on a Thermostable Chitinase from *Bacillus* sp. BG-11, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15: 403-404.
- Bhushan, B. and Hoondal, G.S. 1998. Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Biotechnol. Lett.* 2: 157-159.
- Büyükörük, S., Soyutemiz, G.E., 2010. Geleneksel Olarak Üretilmiş İzmir Tulum Peynirinden *Lactococcus lactis* (*Lactococcus lactis* alttür *lactis* ve alttür *cremoris*) Suşlarının İzolasyonu, Fenotipik ve Moleküler Teknikler ile İdentifikasyonu. *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 7(2),81-87.
- Candy, D. J., Kilby, B. A., 1962. "Studies on chitin synthesis in the desert locust", *J. Exp. Biol.*, 39: 129-140.
- Cauchie, H. M., 2002. "Chitin production by arthropods in the hydrosphere", *Hydrobiology*, 470: 63-96.
- Chang, C.T., Lo, H.F., Wu, C.J. and Sung, H.Y., 2007. Purification And Properties of Chitinase From Cabbage. *International Journal of Biochemistry*, 28, 707-715.
- Chen, J. P. ve Chang, K. C., 1994. "Immobilization of chitinase on a reversibly solubleinsoluble polymer for chitin hydrolysis.", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 60: 133-140.
- Cohen, K. R. ve Chet, I., 1998, "The molecular biology of chitin digestion", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9: 270-277.
- Colinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U., VAD, K., 1993, "Plant chitinases", *Plant J.*, 3: 31 40.
- Daniels, M. J., 1992. Paper technology, 33(6): 14.
- Deshpande, M. V., 1986. "Enzymatic degradation of chitin and its biological applications", *J. Sci. Ind. Res.*, 45(6): 273-281.
- Enzyme Technical Association, 2001. *Enzymes a Primer on Use and Benefits Today and Tomorrow*. 1800 Massachusetts Avenue, N.W. Second Flor Washington, DC 20036. s.1-34
- Flach, J., Pilet, P. E., Jolles, P., 1992. "What's new in chitinase research?", *Experientia*, 48: 701-716.
- Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G., Bahl, H. 2001. Purification And Properties of Two Chitinolytic Enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48, *Arch Microbiol*, 176: 421-426.
- Furlan, S. A., and Pant, H. K., 2006. *Enzyme Technology: General Properties of Enzymes*, (A. Pandey, C.Webb, C.R. Soccol and C. Larroche, Springer Science and Business Media, Inc. And Asiatech Publishers Inc., New York, p 11-37.
- Gardner, K. H. ve Blackwell, J., 1975. "Refinement of structure of beta chitin", *Biopolymers*, 14(8): 1581-1595.
- Gergopapadakou, N. ve Tkacz, J., 1995. "The fungal cell wall as a drug target", *Trends Microbiol.*, 3: 98-104.

- Gooday G. W., 1994. "Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan, In: C. Ratledge editor. Biochemistry and microbial degradation", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 279-312.
- Gooday G. W., 1995. "Diversity of roles for chitinases in nature. In: Zakaria M.B., Wan Muda W.M., Abdullah M.P., editors. Chitin and Chitosan.", Malaysia: Penerbit Universiti Kebangsaan, p. 191-202.
- Gooday, G. W. ve Trinci, A. P. J., 1980. "Wall structure and biosynthesis in fungi. In: Gooday, G. W., Lloyd, D. And Trinci, A. P. J., editors, The Eukaryotic Microbial Cell, p.207- 251." Soc. General Microbiol., Cambridge.
- Gurav, R., Tang, J., & Jadhav, J., 2017. Novel chitinase producer *Bacillus pumilus* RST25 isolated from the shellfish processing industry revealed antifungal potential against phyto-pathogens. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125, 228-234.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M., 2002. *Laboratory exercises in microbiology*. Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466p.
- Henrisat, B., 1991. "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities", *Biochem. J.*, 280: 309-316.
- Henrisat, B., ve Bairoch, A., 1993, "New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities", *Biochem. J.*, 280: 309-316.
- Hirano, S., 1996. "Chitin biotechnological applications. In: Raafat El-Gewely, M., editor", *Biotechnological Annual Review*, Vol.2., Elsevier Press.
- Hoell, I. A., Klemsdal, S. S., Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H., 2005. "Overexpression and characterization of a novel chitinase from *Trichoderma atroviride* strain P1", *Biochem. Biophys. Acta*, 1748: 180-190.
- Horn, S. J. ve Eijsink, V. G. H., 2004. "A reliable reducing end assay for chitooligosaccharides", *Carbohydr. Polym.*, 56: 35-39.
- Iseli, B., Boller, T., Neuhaus, J. M., 1996. "Functional analysis of the domains of a plant PR- 3 chitinase. In: Muzzarelli R.A.A, editor, *Chitin Enzymology*," Vol. 2., Atec Edizioni- Grottammare, p. 136-142.
- John, F. K., 1987. *Enzyme Technology* (H.J. Rehm ve G.Reed editör), *Biotechnology*, Vol.7A. New York s 37-62.
- Kalaylı, E. and Beyatlı, Y., 2003. *Bacillus Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA" ları*. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. 01 (12), 24-35.
- Karademir, A., Akgül, M., ve Tutuş, A., 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5(1).
- Keyhani, N. O. ve Roseman, S., 1997. "Wild-type *Escherichia coli* grows on the chitin disaccharide, N,N'-diacetylchitobiose, by expressing the cell operon", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94(26): 14367-14371.
- Keyhani, N. O., Wang, L. X., Lee, Y. C., ve Roseman, S., 2000. "The chitin disaccharide, N,N'-diacetylchitobiose, is catabolized by *Escherichia coli* and is transported/phosphorylated by the phosphoenolpyruvate: glycose phosphotransferase system", *J. Biol. Chem.*, 275(42): 33084-33090.

- Khor, E. ve Lim, L. Y., 2003. "Implantable applications of chitin and chitosan", *Biomaterials*, 24: 2339-2349.
- Kırk, O., Borchert, T. V., and Fuglsang, C. C., 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 345-351.
- Kombrink, E., ve Somssich, I. E., 1995, "Defense responses of plants to pathogens", *Adv. Bot. Res.*, 21: 2-34.
- Kramer, K. J., Koga, D., 1986. "Insect chitin. Physiological state, synthesis, degradation and metabolic regulation.", *Insect Biochem.*, 16: 851-877.
- Kramer, K. J., Koga, D., 1986. "Insect chitin. Physiological state, synthesis, degradation and metabolic regulation.", *Insect Biochem.*, 16: 851-877.
- Kumar, M. N. V. R., 2000. "A review of chitin and chitosan applications", *React. Funct. Polym.*, 46: 1-27.
- Kuzu S., B., 2008. Kitinaz Üreten Bacillus İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Lee, Y.S, Park I.H, Yoo J.S, Chung S.Y, Lee Y.C, Cho Y.S, Ahn S.C., Kim C.M. and CHOI Y.L. 2006. Cloning, Purification and Characterization of Chitinase From Bacillus sp. DAU101, *Bioresource Technology*.
- Lee, S., Cho, J. S., ve Cho, G., 1999. "Antimicrobial and blood repellent finishes for cotton and nonwoven fabrics based on chitosan and fluoropolymers", *Textile Res. J.*, 69(2): 104-113.
- Lelliott, R. A. and Stead D. E., 1987. *Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell Scientific Publications. p216.
- Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.L., Di Pietro, A., 1993. "Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase", *Phytopathology*, 83: 302-307.
- Madigan, T.M., Martinko, M.J., and Parker, J. 1997. *Brock Biology of Microorganisms*. International Edition, 8th Ed.
- Madsen, G. B, Norman, B. E, and Slott, S., 1973. A New Heat-Stable Bacterial Amylase and its Use In High-Temperature Liquefaction .*Starke* 25, 304.
- Mazeau, K., Winter, W. T. ve Chanzy, H., 1994. "Molecular and crystal structure of a hightemperature polymorph of chitosan from electron diffraction data", *Macromolecules*, 27 (26): 7606-7612.
- Mcclery, B.V. and Matheson, N.K., 1987. *Advances Carbonhydr. Chem.* 44, 147.
- Merzendorfer, H., Zimoch, L., 2003. "Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases", *J. Exp. Biol.*, 206: 4393-4412.
- Minke, M. ve Blackwell, J., 1978. "Structure of alpha-chitin", *J. Mol. Biol.*, 120(2): 67-181.
- Muzzarelli, R. A. A., 1977, "Chitin", Pergamon Press, Oxford.
- Muzzarelli, R. A. A., Ilari, P., Tarsi, R., Dubini, B., Xia, W., 1994. "Chitosan from *Absidia coerulea*", *Carbohydr. Polym.*, 25: 45-50.
- Muzzarelli, R. A. A., 1996, "Chitosan-based dietary foods", *Carbohydr. Polym.*, 29(4): 309- 316.
- Muzzarelli, R. A. A., Terbojevich, M., Muzzarelli, C., Francescangeli, O., 2002. "Chitosans depolymerized with the aid of papain and stabilized as glycosylamines", *Carbohydr. Polym.*, 50: 69 78.

- Nelson, D. L, Cox, M. M, 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Chapter 6. W. H. Freeman, Fourth Edition.
- Ohishi, K., Yamagishi, M., Ohta, T., Suzuki, M., Izumida, H., Sano, H., Nishijima, M., and Miwa, T. 1996. Purification and properties of two chitinases from *Vibrio alginolyticus* H-8. *J. Ferment Bioeng.*, 82: 598-600.
- Pan J., Huang Q., Zhang Y., 2004. Gene cloning and expression of an alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Current microbiology*. 49(3):165-9.
- Pandey, A, and Ramachandran, S, 2006. *Enzyme Technology: General Introduction*, (A. Pandey, C.Webb, C.R. Soccol and C. Larroche, editörler), Springer Science and Business Media, Inc. And Asiatech Publishers Inc., New York, p 1-11.
- Patil, R. S., Ghormade, V. and Deshpande, M. V., 2000, "Chitinolytic enzymes: an exploration.", *Enzyme Microb. Technol.*, 26: 473-483.
- Perrakis, A., Wilson, K. S., Chet, I., Oppenheim, A. B., Vorgias, C. E., 1993. "Phylogenetic relationships of chitinases. In: Muzzarelli R.A.A., editor, *Chitin Enzymology*", Ancona: Eur. Chitin Soc., p. 217-232.
- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.O., Chet, I., Wilson, K.S. and Vorgias C.E., 1994. Crystal Structure of a Bacterial Chitinase at 2.3 oA Resolution. *Structure*, 2, 1169.
- Prakash, O., and Jaiswal, N., 2010. α -Amylase: An ideal representative of thermostable enzymes. *Appl Biotechnol*, 160: 2401-2414.
- Priest F.G., 1993. Systematics and Ecology of *Bacillus*. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, editors. *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*. Washington, D.C.: ASM Press. pp. 3-16.
- Ramirez, M. G, Avel,zapa I. L. R, Avel,zapa N. G. R. and Camar,llo R. C., 2003. Colloidal Chitin Stained With Remozal Brilliant Blue R, A Useful Substrate to Select Chitinolytic Microorganisms and to Evaluate Chitinases, *Journal of Microbiological Methods* 56: 213-219.
- Rast D. M., 1993. "Nomenclature. In: Muzzarelli R.A.A., editor. *Chitin Enzymology*", Ancona: Eur. Chitin Soc., p.VII-VIII.
- Revahmoiseey, S. and Carroad, P. A., 1981. "Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein", *Biotechnol. Bioeng.*, 23: 1067-1078.
- Rishad, K. S., Rebello, S., Shabanamol, P. S., & Jisha, M. S., 2017. Biocontrol potential of Halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel *Bacillus Pumilus* MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem. *Pesticide biochemistry and physiology*, 137, 36-41.
- Rudall, K. M. ve Kenchington, W., 1973. "Chitin system", *Biologic. Rev. Cambridge Philosophic. Soc.*, 48(4): 597.
- Sarıbuğa, E., 2013. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* Bakterilerinden Fitaz Enziminin Kısmen Saflaştırılması Ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.
- Saygılı, H., Şahin, F., ve Aysan, Y., 2006. "Fitobakteriyoloji." Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye.

- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. ve Jeon, Y. J., 1999. "Food applications of chitin and chitosan", *Trends Food Sci. Tech.*, 10: 37-51.
- Shaikh, S. A., Deshpande, M. V., 1993. "Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research", *World J Microbiol. Biotechnol.*, 9(4): 468-475.
- Spindler, K. ve Spindler, B. M., 1990. "Chitin metabolism: a target for drugs against parasites", *Parasitol. Res.*, 76: 283-288.
- Spindler, K., Spindler, B.M., 1990. "Chitin metabolism: a target for drugs against parasites", *Parasitol. Res.*, 76: 283-288.
- Sunny, M. C., Ramesh, P., Varma, H. K., 2002. "Microstructured microspheres of hydroxyapatite bioceramic", *J. Materials Sci. Materials in Medicine*, 13(7): 623-632.
- Synowiecki, J. ve Al-Khateeb, A. N., 2003. "Production, Properties, and Some New Application of Chitin and Its Derivatives", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2): 145-171.
- Tanaka, T., Fukui, T., Atomi, H. ve Imanaka, T., 2003. "Characterization of an exo- β -Dglucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic Archaeon *thermococcus kodakaraensis* KOD 1", *J. Bacteriol.*, 185(17): 5175-5181.
- Tanaka, T., Fukui, T., Atomi, H. ve Imanaka, T., 2003, "Characterization of an exo- β -Dglucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic Archaeon *thermococcus kodakaraensis* KOD 1", *J. Bacteriol.*, 185(17): 5175-5181.
- Tarakçioğlu, S., 2016. Erzurum Ilıca Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve *Bacillus Thermoamylovorans* ST-10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterisasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fenbilimleri Enstitüsü Atatürk Üniversitesi.
- Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Ueda, M., and Arai, M. 1992. Purification and some properties of chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56: 460-464.
- Vahed, M., Motalebi, E., Rigi, G., Akbari Noghabi, K., Soudi, M. R., Sadeghi, M., & Ahmadian, G. (2013). Improving the chitinolytic activity of *Bacillus pumilus* SG2 by random mutagenesis. *J Microbiol Biotechnol*, 23(11), 1519-1528.
- Wiwat, C., Siwayaprahm, P. and Bhumiratana, A., 1999. Purification and Characterization of Chitinase from *Bacillus Circulans* No.4.1. *Current Microbiology*, 39, 134-140.
- Wolfson, D. Olmstead, S., Meiss, D., and Ralston, J., 2008. Making Sense of Digestive Enzymes. KLAIRE LABSTM . A division of ProTheraR,
- Worthington Biochemical Corporation, 1972. Introduction to Enzymes.
- Yoruç, A. B. H., & Uğraşkan, V., 2017. Yeşil Polimerler ve Uygulamaları. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 17, 318-337.
- Yuli, E.P., Suhartono, T., Rukayadi, Y., Hwang, J.K. and Pyun, R.Y., 2004. Characteristics of Thermostable Chitinase Enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 147-153.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: Yakup Emre

Soyadı: KIZILER

Doğum Tarihi: 07.10.1992

Doğum Yeri: ERZURUM

Medeni Hali: Bekar

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lise : Atatürk Anadolu Teknik Lisesi (2006)

Lisans : Atatürk Üniversitesi
Ziraat Fakültesi (2011-2015)

Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü (2015-2017)

İŞ TECRÜBESİ

Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü (2014) – Stajyer – Trabzon

Türk Silahlı Kuvvetleri bünyesinde Kara Kuvvetleri Komutanlığı emrinde Piyade Teğmen olarak halen görev yapmaktayım.