



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

**TOKAT ALMUS BARAJ GÖLÜ TABANINDAN ELDE EDİLEN
MİKROBİYAL İZOLATLARIN KİTİNAZ AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BEGÜM BUSE ÜZER

Danışman: Prof.Dr. İsa KARAMAN

TOKAT- 2022

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

BEGÜM BUSE ÜZER

13 Nisan 2022

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın belirlenmesinden başlayarak tüm yüksek lisans hatta lisans öğrenimim boyunca, ilgi ve alakasını asla esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bana çok şey katan, tüm laboratuvar denemelerimde her türlü desteği sağlayan sayın danışman hocam Prof.Dr. İsa KARAMAN' a, bir çok konuda fikir ve desteğini aldığım Prof.Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ' ye, malzeme temini esnasında yaşadığım zorluklarda bana destek olan Dr.Öğr.Üyesi Zeynep AKŞİT ve Dr.Öğr.Üyesi Hüseyin AKŞİT hocalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitim sürecimde beraber yol aldığımız, her türlü zorlukta desteğini hep hissettiğim sevgili ev arkadaşım Maylad ALMANA ve laboratuvar çalışmalarında her türlü yardımı sağlayan Joseph Olasubomi BİSHİ' ye teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her kararında beni destekleyen, maddi manevi her konuda arkamda duran, bugünlere gelmemde en büyük emeği sarf eden ve hakkını asla ödeyemeyeceğim babam Türker ÜZER ve annem Gül ÜZER'e kalpten teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 2020/111 No'lu “ Tokat Almus Baraj Gölü Tabanından Elde Edilen Mikrobiyal İzolatların Kitinaz Aktivitelerinin Araştırılması” projesi tarafından desteklenmiştir.

BEGÜM BUSE ÜZER

13 Nisan 2022

ÖZET

TOKAT ALMUS BARAJ GÖLÜ TABANINDAN ELDE EDİLEN MİKROBİYAL İZOLATLARIN KİTİNAZ AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Üzer, Begüm Buse

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsa Karaman

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

Mayıs 2022, xvi + 94 sayfa

Yapılan bu çalışmada, Ülkemizin Tokat ili Almus ilçesinde bulunan Almus Baraj Gölü'nün farklı noktalarından mikrobiyal izolatlar alınmış ve bu izolatların içerisinde kitinaz aktivitesi olan bakteriler izole edilmiştir. Kitinaz aktivitesi gösteren bakterilerin saf kültürleri hazırlanmış ve kitinaz aktiviteleri çeşitli yöntemlerle ölçülmüştür. Kitin molekülünü parçalama yeteneği en yüksek olan suşlar belirlendikten sonra, üç farklı kolloidal kitin örneği içerisinde enzim aktivitesinin en yüksek olduğu kolloidal kitin örneği belirlenmiş ve aktivitesi yüksek olan suşların; pH ve sıcaklık stabilite tayinleri yapılmış, optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Sonrasında çeşitli inhibitör ve aktivatörlerin enzim aktivitesi üzerine etkileri test edilmiştir. Deneyler sırasında kullanılan tüm bakterilerden daha sonraki kitin degradasyonu ile ilgili olan çalışmalarda kullanabilmek adına stok kültürler hazırlanmıştır. Çalışmanın sonucuna göre izole edilmiş olan bakteri kültürlerinin bazik ve mezofilik olduğu tespit edilmiştir. Optimum pH değerleri; B-98 için 9.0, B-123 için 10.5, B-124 için 8.5 olarak, optimum sıcaklık değerleri ise 40 °C olarak belirlenmiştir. Çeşitli kimyasallar ile yapılan deneyler sonucunda ise kitinaz enzimi üzerinde inhibe ve aktive edici özellik taşıyan kimyasallar tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Kitinaz, Aktivite, Degradasyon, Kitin, DNS

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CHITINASE ACTIVITIES OF MICROBIAL ISOLATES OBTAINED FROM THE BASE OF TOKAT ALMUS DAM LAKE

Uzer, Begum Buse

TOKAT GAZİOSMANPAŞA UNIVERSITY GRADUATE EDUCATION
INSTITUTE

Master of Science, Department of Bioengineering

Thesis Advisor: PROF. Dr. İsa Karaman

BIOENGINEERING DEPARTMENT

May 2022, xvi + 94 pages

In this study, microbial isolates were taken from different points of the Almus Dam Lake in the Almus district of Tokat province in our country, and bacteria with chitinase activity were isolated from these isolates. Pure cultures of bacteria showing chitinase activity were prepared and their chitinase activities were measured by various methods. After the strains with the highest ability to break down the chitin molecule were determined, the colloidal chitin sample with the highest enzyme activity was determined among three different colloidal chitin samples, and the strains with high activity; pH and temperature stability determinations were made, optimum pH and optimum temperature values were determined. Afterwards, the effects of various inhibitors and activators on enzyme activity were tested. Stock cultures were prepared from all the bacteria used during the experiments to be able to use them in subsequent studies related to the degradation of chitin. According to the results of the study, it was determined that the isolated bacterial cultures were basic and mesophilic. Optimum pH values; 9.0 for B 98, 10.5 for B-123, 8.5 for B-124, and optimum temperature values were determined as 40 °C. As a result of experiments with various chemicals, chemicals with inhibiting and activating properties on the chitinase enzyme were determined.

KEYWORDS: Chitinase, Activity, Degradation, Chitin, DNS

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER LİSTESİ	viii
GRAFİKLER LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Enzimler	3
2.1.1. Bakteri kökenli (mikrobiyal) enzimler	4
2.2 Kitin	5
2.2.1.Kitin molekülünün genel özellikleri	5
2.2.2.Kitin molekülünün kimyasal yapısı	6
2.2.3.Kitin ve kitosanın kullanım alanları	7
2.3.Kitinaz Enzimi	8
2.3.1.Kitinaz enziminin genel özellikleri	8
2.3.2. Kitinaz ve kitosanaz enzimi etki mekanizması	9
2.3.3.Kitinaz enziminin sınıflandırılması	10
2.3.4.Kitinaz enziminin kullanım alanları	13
3.MATERYAL ve METOD	14
3.1.Materyal.....	14
3.1.1.Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların izole edileceği toprak örnekleri	14

3.1.2.Çalışmada kullanılan matriks karışımı	14
3.1.3.Çalışmada kullanılan besiyerleri	15
3.1.4.Çalışmada kullanılan tampon çözeltiler.....	22
3.1.5.DNS çözeltisi	26
3.1.6.Çalışmada kullanılan fungus türleri.....	26
3.1.7.İnce tabaka kromatografisi (TLC) için kullanılan solüsyonlar	26
3.1.8.Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri	27
3.2.Metod	29
3.2.1.Toprak örneklerinin toplanması	29
3.2.2.Toprak örneğinden elde edilen bakterilerin saflaştırılması, matriks karışımı ile stoğa alınması ve saklanması.....	30
3.2.3.Stokların yenilenmesi ve kontrolü.....	31
3.2.4.Standart koloidal kitinin hazırlanması	32
3.2.5. Standart koloidal kitin kullanılarak hazırlanan chda agarda kitinaz üreten bakteri suşlarının tespit edilmesi.....	34
3.2.6.Böcek ekzo iskeletleri (crab shells) kullanarak koloidal kitin hazırlanması..	35
3.2.7.Böcek ekzo iskeletleri (crab shells) kullanılarak hazırlanan chda agarda kitinaz üreten bakteri suşlarının tespit edilmesi.....	35
3.2.8.Fungal hifler kullanılarak koloidal kitin hazırlanması	36
3.2.9.Fungal hifler kullanılarak hazırlanan chda agarda kitinaz üreten bakteri suşlarının tespit edilmesi	39
3.2.10.Kitinaz enziminin kısmi saflaştırılması	40
3.2.11. CHDA besiyerinde kitinaz aktivitesinin saptanması	42
3.2.12.Kitinaz aktivitesinin dns ile saptanması.....	43
3.2.13. TLC kromatografisi	44
3.2.14.Enzim aktivitesinin belirlenmesi için nag standart grafiği oluşturulması.....	45
3.2.15.Bradford metodu kullanılarak protein miktarının belirlenmesi.....	46

3.2.16. Kitinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi.	47
3.2.17. Kitinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi.....	49
3.2.18.Kitinaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi	50
3.2.19.Kitinaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi	51
3.2.20. Çeşitli kimyasalların kitinaz enzimi aktivitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi.....	52
4.BULGULAR.....	54
4.1.Bulgular	54
4.1.1.Almus baraj gölünden örneklerin toplanması, saflaştırılması ve stoğa alınması	54
4.1.2.CHDA agarda kitinaz üreten suşların belirlenmesi	54
4.1.3.Kolloidal kitinin hazırlanması	54
4.1.4.CHDA besiyerinde kitinaz aktivitesinin saptanması	55
4.1.5.Kitinaz enziminin kısmi olarak saflaştırılması.....	60
4.1.6.CHDA agarda kitinaz aktivitesinin belirlenmesi	61
4.1.7.Kitinaz aktivitesinin dns ile saptanması.....	62
4.1.8.TLC kromatografisi	63
4.1.9.Enzim aktivitesinin belirlenmesi için nag grafiği oluşturulması.....	65
4.1.10. Bradford metodu kullanılarak protein miktarının belirlenmesi.....	66
4.1.11.Kitinaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi	67
4.1.12.Kitinaz enziminin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi	73
4.1.13. Kitinaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi	78
4.1.14.Kitinaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi	80
4.1.15.Çeşitli kimyasalların kitinaz enzimi aktivitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi.....	82
4.2.Tartışma.....	87

5. SONUÇ.....	89
6.KAYNAKLAR	90
7.ÖZGEÇMİŞ	94



ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1.Fosfat-Sitrat tamponunun hazırlanması.....	22
Çizelge 3.2.Sodyum-Fosfat tamponunun hazırlanması.....	23
Çizelge 3.3.Glisin-NaOH tamponunun hazırlanması.....	24
Çizelge 3.4.Boraks-NaOH tamponunun hazırlanması.....	25
Çizelge 4.1.Kısmi enzim saflaştırması için gereken alkol miktarı.....	60
Çizelge 4.2.CHDA agarda clearzone oluşumları.....	61
Çizelge 4.3.DNS ile kitinaz aktivitesi ölçüm sonuçları.....	63
Çizelge 4.4.Rf değerlerinin ölçüm sonuçları.....	65
Çizelge 4.5.Fosfat- sitrat tamponunda pH ölçüm ve relatif aktivite sonuçları.....	69
Çizelge 4.6.Sodyum- fosfat tamponunda pH ölçüm ve relatif aktivite sonuçları.....	70
Çizelge 4.7.Glisin- NaOH tamponunda pH ölçüm ve relatif aktivite sonuçları.....	71
Çizelge 4.8.Borax- NaOH tamponunda pH ölçüm ve relatif aktivite sonuçları.....	72
Çizelge 4.9.30-40 °C arası sıcaklıklarda absorbans ve aktivite (%) değerleri	75
Çizelge 4.10.50- 100 °C arası sıcaklıklarda absorbans ve aktivite (%) değerleri	76

Çizelge 4.11. Kitinaz Enziminin pH Stabilitesinin Belirlenmesi.....	78
Çizelge 4.12. Kitinaz Enziminin Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi.....	80
Çizelge 4.13. Çeşitli kimyasalların b-98 kodlu bakterinin enzim aktivitesi üzerinedeki etkilerinin belirlenmesi.....	82
Çizelge 4.14. Çeşitli kimyasalların b-123 kodlu bakterinin enzim aktivitesi üzerinedeki etkilerinin belirlenmesi.....	83
Çizelge 4.15. Çeşitli kimyasalların b-124 kodlu bakterinin enzim aktivitesi üzerinedeki etkilerinin belirlenmesi.....	84

GRAFİKLER LİSTESİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
Grafik 4.1. CHDA agarda clearzone oluşumları.....	62
Grafik 4.2. N-Asetil glukozamin standart grafiği.....	66
Çizelge 4.3. BSA standart grafiği.....	67
Grafik 4.4. Optimum pH değerleri.....	73
Grafik 4.5. Optimum sıcaklık değerleri.....	77
Grafik 4.6. pH stabilitesi değerleri.....	79
Grafik 4.7. Sıcaklık stabilitesi değerleri.....	81

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.Enzimlerin etki mekanizması.....	4
Şekil 2.2.Enzimlerin etki mekanizması.....	6
Şekil 2.3.Kitin ve kitosanin deşredasyonu.....	9
Şekil 3.1.Fosfat-Sitrat tamponu.....	22
Şekil 3.2.Sodyum-Fosfat tamponu.....	23
Şekil 3.3.Glisin-NaOH tamponu.....	24
Şekil 3.4.Boraks- NaOH tamponu.....	25
Şekil 3.5.Toprak örneklerinin toplanması.....	29
Şekil 3.6. Örneklerin stoğa alınması.....	30
Şekil 3.7.Stoklardan alınan örneklerin damlatma metodu ile ekimi.....	31
Şekil 3.8.Kolloidal kitinin hazırlanması.....	33
Şekil 3.9.Kullanılan petri kaplarının bölünmesi.....	34
Şekil 3.10.SDB içersine fungusların inoküle edilmesi.....	36
Şekil 3.11.Aspergillus flavus hifleri kullanılarak hazırlanan kolloidal kitin.....	37
Şekil 3.12.Aspergillus niger hifleri kullanılarak hazırlanan kolloidal kitin.....	37
Şekil 3.13.Phoma tracheiphila hifleri kullanılarak hazırlanan kolloidal kitin.....	37
Şekil 3.14.Fungusların filtre edildikten sonraki görüntüsü.....	38
Şekil 3.15.Kısmi enzim saflaştırma.....	41
Şekil 3.16.CHDA besiyerinde durham tüpü ile açılan kuyucuklar.....	42

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.17.Kullanılan tlc tankı.....	44
Şekil 3.18.Enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların etkisi.....	53
Şekil 4.1.CHDA 1 besiyerinde kitinaz aktivitesi.....	56
Şekil 4.2.CHDA 2 besiyerinde kitinaz aktivitesi.....	57
Şekil 4.3.CHDA 3 besiyerinde kitinaz aktivitesi.....	58
Şekil 4.4.Tlc kromotografi sonuçlarının uv ışık altında görüntülenmesi.....	64
Şekil 4.5.Kitinaz enziminin optimum ph değerinin belirlenmesi.....	68

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler/Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
µL	Mikrolitre
A	Absorbans
Atm	Atmosfer basıncı
BaCl ₂	Baryum Klorür
BSA	Sığır Serum Albumin
C ₂ H ₅ NO ₂	Glisin
C ₆ H ₈ O ₇	Sitrik Asit
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
CHDA	Chitinase- Detection Agar
Cm	Santimetre
CoCl ₂	Kobalt (II) Klorür
CuCl ₂	Bakır (II) Klorür
Dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNS	Dinitro salisilik asit

EDTA	Etilendiamin tetrasetik asit
FeCl ₃	Demir (III) Klorür
G	Gram
H ₂ O	Su
H ₃ PO ₄	Fosforik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
HgCl ₂	Civa (II) Klorür
KCl	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	Monopotasyum fosfat
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
LB	Luria- Bertoni Broth
M	Molarite
Mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
ML	Mililitre
Mm	Milimetre
MnCl ₂	Mangan (II) Klorür
N	Normalite
NA	Nutrient Agar

Simgeler/Kısaltmalar**Açıklamalar** $\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$

Boraks

 Na_2HPO_4

Disodyum Fosfat

 Na_2SO_3

Sodyum Sülfid

 NaCl

Tuz

NAG

N-Asetil glukozamin

 NaH_2PO_4

Monosodyum Fosfat

 NaOH

Sodyum Hidroksit

NB

Nutrient Broth

 NH_4Cl

Amonyum Klorür

 NiCl_2

Nikel (II) Klorür

Nm

Nanometre

pH

Asitlik derecesi

PMSF

Phenylmethysulfonyl Fluoride

R

Yarıçap

Rcf

Relative centrifugal force

(rölatif santrifüj kuvveti)

Simgeler/Kısaltmalar**Açıklamalar**

Rf

Yürüme hızı

Rpm

Revolution per minute

(dakikadaki devir sayısı)

SDB

Sabouraud Dextrose Broth

 ZnCl_2

Çinko Klorür

mM

Milimolar

1.GİRİŞ

Enzimler, çok çeşitli biyokimyasal reaksiyonları meydana getirmek için canlı hücreler tarafından üretilen ve hücrelerin metabolik süreçlerinin parçalarını oluşturan biyokatalizörlerdir. Enzimler sadece hücre içinde değil hücre dışında da aktivite gösterebilmektedir. Enzimlerin hücre dışı aktivitelerinin endüstriyel anlamda kullanımı yüzyıllar öncesine yani enzimlerin doğası ve işlevlerinin anlaşılmasından çok önceye dayanmaktadır. Enzimlerin çok eski zamanlarda kullanımına deri yapımında gübrenin kullanılması, arpa maltının nişasta dönüşümü için biracılıkta kullanılması ve yoğurt, peynir üretimi örnek olarak verilebilir (Underkofler ve ark., 1958). Enzimler biyoteknolojideki ilerlemeler sayesinde gıda endüstrisi, tıp, fotoğrafçılık endüstrisi, kimya endüstrisi, temizlik endüstrisi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Enzimler bitkisel kaynaklardan, hayvansal kaynaklardan ve mikrobiyal kaynaklardan izole edilebilirler. Mikrobiyal enzimler daha stabil olması, istenmeyen yan ürünler oluşturmaması, maliyetinin düşük olması ve elde edilen ürün miktarının fazla olması sebebiyle diğer enzim türlerine göre daha fazla tercih edilmektedir. Örneğin doğada en çok bulunan polimerler arasında ikinci sırada bulunan kitin polimerini degrede eden kitinaz enzimi, eklem bacaklıların dış iskeletinin parçalanması, balık ve kabuklu deniz canlılarının atıklarının degradesyonu, biyoyumlu ve biyodegrede olabilen malzemelerin üretilmesi ve haşerelere karşı biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılması gibi birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Kitinazların rolleri bulundukları organizmalara göre farklılık göstermektedir. Örneğin bakterilerde kitinin enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılmasını sağlayan kitinaz enzimi, bitkilerde funguslara karşı üretilen bir savunma sistemi olarak kullanılmaktadır (Bai, 2015). Birçok kabuklu ve eklem bacaklıların meydana getirdiği atıkların giderilmesinde sucül ekosistemlerde bulunan ve kitinaz enzimi üreten bakteriler görev almaktadır (Kuzu, 2008).

Bu tez çalışmasında Tokat' ın Almus ilçesinde yer alan Almus Baraj Gölü tabanından alınmış olan örneklerdeki mikroorganizmaların kitinaz üretme yeteneklerinin tespiti üzerine çalışmalar yapılmıştır. Kitinaz üreten bakteri suşları tespit edildikten sonra örneklerdeki bakterilerin üretmiş olduğu kitinaz enziminin karakterizasyonunun tespiti amacıyla; optimum pH ve sıcaklığın belirlenmesi, TLC kromatografisi, sıcaklık ve pH stabilizasyonu ve enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların etkisi araştırılmıştır.



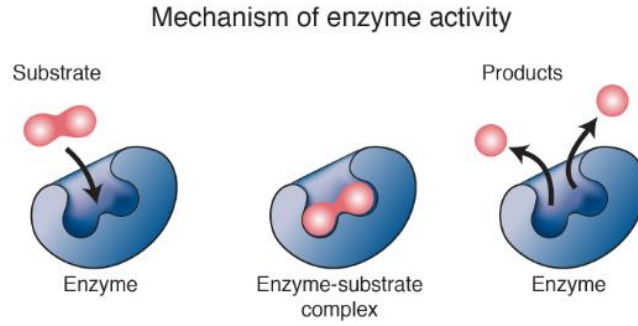
2.GENEL BİLGİLER

2.1.Enzimler

Enzimler, canlı organizma metabolizmalarında meydana gelen, birçok biyokimyasal reaksiyonun koordinesini sağlayan ve ana yapısı proteinden oluşan biyokatalizörlerdir. Kimyasal katalizörlerle kıyaslandığı zaman daha avantajlı moleküllerdir. Eğer uygun koşullar sağlanırsa sadece in vivo olarak değil in vitro olarak da etki gösterebilirler. Yalnızca in vivo değil, in vitro olarak da kullanılabilir olmaları kullanım alanları konusunda oldukça çeşitlilik sağlamaktadır (Tolan, 2015).

Enzimler, protein ana yapısında bulunan moleküllerdir. Enzimler protein içeren bölgesi APOENZİM ve protein içermeyen bölgesi KOFAKTÖR olmak üzere iki kısımdan oluşur. Apoenzim ve Koenzim' in birleşip meydana getirdiği yapıya HALOENZİM (aktif enzim) olarak isimlendirilir. Enzimlere direkt olarak bulundukları protein yapılarıyla etkili olabilmeleri durumunda basit enzim ve etkili hale gelebilmesi için aktive edici bir maddeye (kofaktör) yani organik moleküllere (koenzim) veya metal iyonlarına ihtiyaç duyması durumunda konjuge enzim adı verilir. Enzimin inaktif haldeyken sadece proteinden oluşan kısmına Zimojen, Proenzim ya da Preenzim adı verilir. Basit yapıda bulunan enzimlerin polipeptid zinciri kısmı katalitik aktivite gösteren bölgesidir (Underkofler ve ark., 1958).

Enzimlerin çalışma prensibi katalizörler gibi tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürerek tepkime hızını artırma prensibine dayanır. Ancak enzimler tepkime sonunda katalizörler gibi tükenmez, tepkime dengesinde değişikliğe sebep olmaz ve enzimler çoğu katalizörlere kıyasla spesifik moleküllerdir. Enzimlerin etki ettikleri maddeler substrat, substratlar ile reaksiyonu sonucu ortaya çıkan maddelere ise ürün adı verilir. Enzimler yalnızca özgül substratları ile etkileşime girerler. Enzimlerin aktif bölgesine substratların bağlanmasında; hidrofobik etkileşimler, kovalent bağlar, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi kuvvetler etkili olmaktadır (Kuzu, 2008).



Şekil 2.1. Enzimlerin etki mekanizması (Anonim, 2003)

2.1.1. Bakteri kökenli (mikrobiyal) enzimler

Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler kalitatif aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmaması ve üretim prosesinde hayvansal, bitkisel ve kimyasal enzimlere kıyasla daha az maliyetle daha fazla ürün elde edilebilmesi sebebiyle çok fazla alanda popüler olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyal kökenli enzimler ekstrasellüler enzimler (ekzoenzimler) ve intrasellüler enzimler (endoenzimler) olarak iki gruba ayrılmaktadır.

İntrasellüler enzimler: Enzim hücre içerisinde sentezlenir ve hücre içinde çevreden korunmuş bir şekilde hücrede alıkonularak metabolizma ile ilgili olayların gerçekleştirilmesinde etkinlik gösterirler. Bu enzim grubuna, oksidoredüktazlar, DNA polimeraz, RNA polimeraz, DNA ligaz, transferaz, nükleaz gibi enzimler birkaç örnek olarak gösterilebilir.

Ekstrasellüler enzimler: Enzimler hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınır ve hücre dışında büyük molekülü maddelerin (lipid, protein, polisakkarit gibi) parçalanmasında görev alırlar. Bu enzimler genel olarak hidrolazlar olarak isimlendirilir. Mikroorganizmanın üretildiği dış ortamın kimyasal ve fiziksel özelliklerine karşı stabil özelliklere sahip olması gerekir. Kullanılacak olan enzimin üretimi mikroorganizma için gerekli olan miktar kadar üretilebilir. Ekstrasellüler enzimler, enzim üretiminin miktarının kontrol edilebilmesi ve üretim maliyetinin düşük olması sebebiyle endüstri için vazgeçilmez moleküller olmuşlardır (Kuzu, 2008).

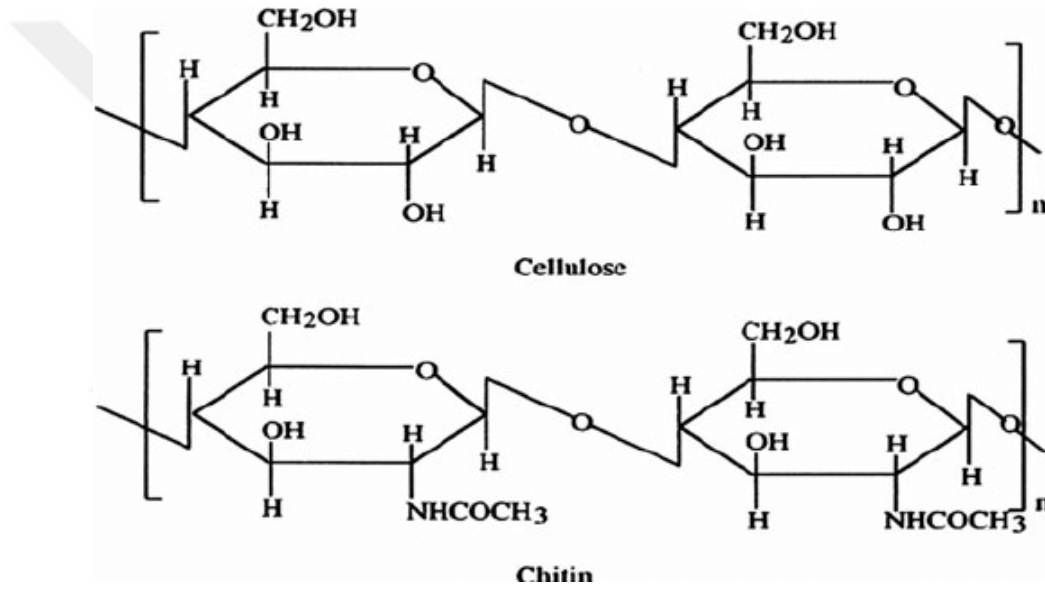
2.2 Kitin

2.2.1.Kitin molekülünün genel özellikleri

Kitin, N-asetil- D glukoz- 2 âmin birimlerinin β (1,4) glikozit bağları ile bağlanması sonucu oluşan bir polisakkarit olup, doğal polimerler arasında selülozdan sonra doğada en bol bulunan ikinci biyopolimerdir. Kitinin birçok türevi bulunmaktadır ancak en önemli türevi kitosandır. Kitin çok geniş kaynaklardan düşük maliyet ile elde edilebilir. Bu özelliği kitinin biyomalzeme olarak kullanılmasını elverişli kılsada suda ve birçok çözücüde çözünmüyor olmasından dolayı genellikle çözünürlük oranını arttırmak için deasetilasyon ile kitosana dönüştürülerek kullanılır. Genellikle dönüşüm sürecinde KOH ve NaOH kimyasalları kullanılır. Kitin, crustacea olarak adlandırılan kabukluların ve eklem bacaklıların epidermislerinin, mantarların hücre duvarının, yumuşakçaların radula adı verilen dişli dil kısmının ve kafadan bacaklıların ağız kısmının ana bileşenidir (Shahidi ve ark., 1999). Ayrıca coelantertes, yeşil deniz yosunları, protozoanlar ve tabiatla bulunan diğer hayvanların eklem yerlerinde az miktarda kitin bulunmaktadır. Dünya üzerinde 23×10^3 tonu istiridyelerden, 32×10^3 tonu mantarlardan, 39×10^3 tonu çeşitli deniz canlılarından ve 56×10^3 tonu karidesten olmak üzere yılda yaklaşık 150×10^3 ton kitin elde edilmektedir. Bu ürünlerin değerlendirilmesi hem ekonomik açıdan hemde çevre açısından kazanç sağlamaktadır (Eagle, 2003).

2.2.2.Kitin molekülünün kimyasal yapısı

N-asetil glikozamin birimlerinin β (1,4) glikozit bağları ile bağlanması sonucu oluşan bir polisakkarittir. Kitin molekülü suda ve birçok çözücünde çözünmez yani hidrofobiktir. Kitin molekülü yapısal olarak selüloza çok benzemektedir. Aralarındaki fark ise; Selülozda ikinci karbon atomuna bağlı bulunan bir hidroksil grubu (-OH) bulunurken, kitinde asetamid (-NHCOCH₃) grubunun bulunmasıdır.



Şekil 2.2. Selüloz ve kitinin yapısı (Chawla ve ark., 2015)

2.2.3.Kitin ve kitosanın kullanım alanları

Doğal kaynaklardan kolay ve düşük maliyetle elde edilebilen, diğer polimerler ile uyumu yüksek derecede olan ve biyolojik ve kimyasal aktifliği yüksek olan kitin ve türevleri birçok alanda kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları;

- Gıda Sektöründe, antifungal ve antibakteriyel özelliklerinde faydalanılarak meyve ve sebzelerin korunması amacıyla, soslar için kıvam arttırıcı olarak, sütlerin işlenmesinde, hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak ve atık gıdaların tekrar işlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.
- Kozmetik Sektöründe, akne tedavisi amacıyla, saçtaki elektriklenmenin azaltılması amacıyla şampuanlarda, derideki nem dengesinin korunması amacıyla kremlerde, oral hijyenin sağlanabilmesi, çürük oluşumunun önlenmesi amacıyla diş macunu ve ağız gargaralarında ve cilt tonunun eşitlenmesi amacıyla kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadır.
- Tarım Sektöründe bitki büyümesini hızlandırmak amacıyla, bitkilerin savunma mekanizması arttırmak amacıyla, donmaya karşı bitkiyi korumak amacıyla, tohum kaplanmasında ve besin elementlerinin toprağa salınmasının zamana bağlı olarak ayarlanmasında kullanılmaktadır.
- Su ve Kirlilik Temizliğinde, suyu berraklaştırmak amacıyla, sudan metal iyonlarını uzaklaştırmak amacıyla, sentetik polimerlerin giderimi amacıyla, kokunun azaltılması amacıyla kullanılmaktadır.
- Tıpta, sütürlarda (dikişlerde), hücre proliferasyonunun (hücre artışının) desteklenmesinde, fibroplazinin (fibröz doku artışının) engellenmesinde, kontrollü ilaç salınım sistemlerinde, kollajen miktarının arttırılmasında ve kontakt lens yapımında kullanılmaktadır.
- Biyoteknolojide, kromotografik yöntemlerde hücre immobilizasyon tekniklerinin tamamında kullanılmaktadır (Ozdemir, 2014; Oyar 2016).

2.3.Kitinaz Enzimi

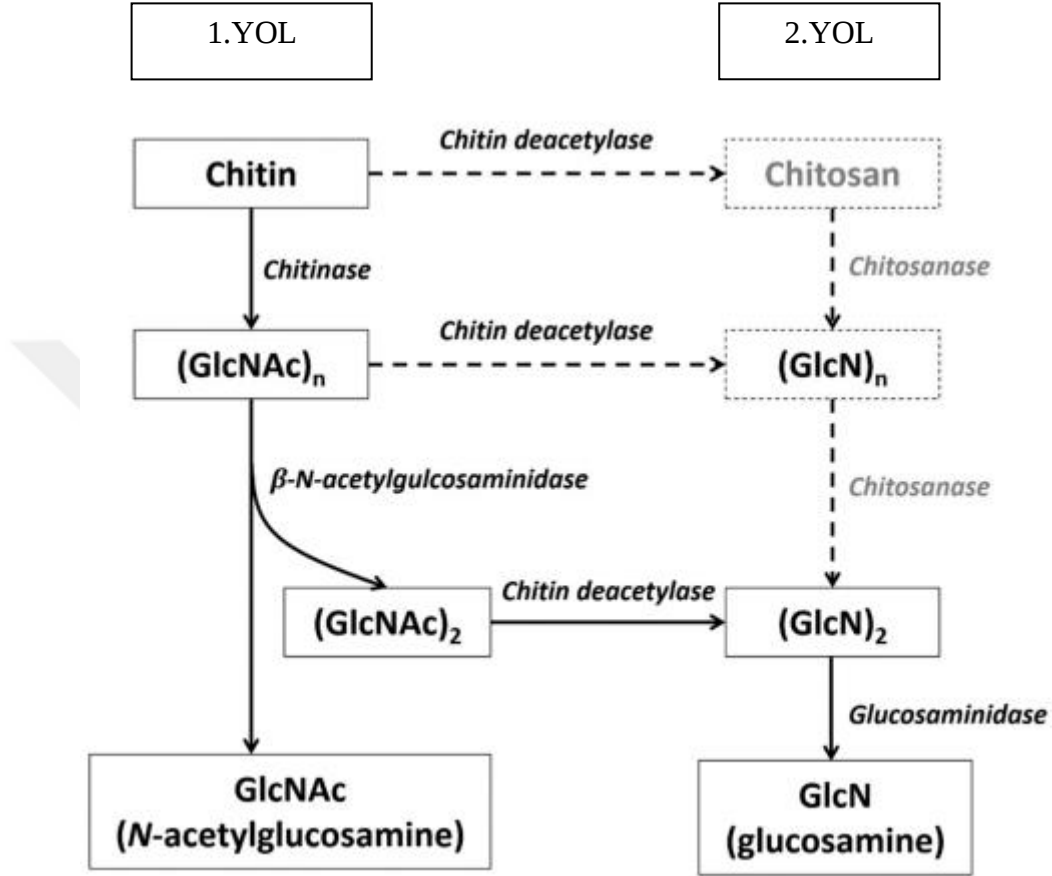
2.3.1.Kitinaz enziminin genel özellikleri

Kitin ve kitosan, doğal sistemlerde çok fazla üretilen bir polisakkarittir. Çok büyük miktarlarda üretilmesine rağmen kitin ve kitosan moleküllerini parçalayan enzimler sayesinde doğal sistemde birikme oranları üretim miktarı kadar fazla değildir. Kitin içerisindeki glikozidik bağları parçalayarak kitini degrede eden enzim kitinaz enzimi, kitosanı degrede eden enzim ise kitosanaz enzimidir. Kitinazlar başlıca; *Bacillus*, *Serratia* ve *Vibrio* türleri tarafından üretilmektedir.

Kitinaz enzimi mantarlar, eklem bacaklılar, kabuklu canlılar, mikroorganizmalarda, nematodlarda (ipliksi solucanlarda), yeşil bitkiler ve bazı omurgalılar olmak üzere birçok organizmada bulunmakta ve çeşitli fizyolojik ve ekolojik fonksiyonlarında önemli roller oynamaktadır.

Kitin, birçok kabuklu ve eklem bacaklı canlının dış iskeletini oluşturmaktadır ve bu canlıların ölmesi üzerine trilyonlarca kabuk sucul ekosistemlerde diplere birikmektedir. Okyanus ve deniz diplerinde bulunan kitinaz enzimi içeren mikroorganizmalar sayesinde (özellikle *Vibrio furnissi*) biyolojik arıtım meydana gelmektedir (Kuzu, 2008).

2.3.2. Kitinaz ve kitosanaz enzimi etki mekanizması



Şekil 2.3. Kitin ve kitosanın degradasyonu (Zhang ve ark., 2021)

Birinci pathwayde, kitinaz enzimi kitin molekülünde yer alan β (1,4) glikozidik bağlarını hidrolize ederek, oligomerik beta- N- asetilglukozamin (GlcNAc) birimlerine dönüştürür. Beta- N- asetilglukosaminidaz (NAG) enzimi ise, ortaya çıkan oligosakkaritleri (poli GlcNAc) GlcNAc monomerlerine dönüştürür. Bu pathway kitinin hidrolizi ya da kinolitik mekanizma olarak adlandırılır. İkinci pathwayde kitin molekülü deasetilesyondan geçirildikten sonra kitosana dönüştürülür ve kitosanazlar tarafından hidrolize edilir ve glukozaminidaz enzimi tarafından glukozamine (GlcN) indirgenir (Zhang ve ark., 2021).

2.3.3.Kitinaz enziminin sınıflandırılması

Kitini enzimatik olarak hidrolize eden kitinazlar iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

- Endokitinazlar
- Ekzokitinazlardır.

Endokitinazlar, kitini iç bölgelerinde rastgele bölerek moleküler kütlesi düşük diasetilkitobiyoz, kitotetraoz ve kitotrioz gibi N-asetilglukozamin multimerik ürünlerini oluştururlar.

Ekzokitinazlar, kendi içerisinde iki alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar; Kitobiosidazlar ve (NAGase) β -1,4-*N*-asetilglukosaminidazlardır. Kitobiosidazlar, kitin molekülünün mikrofibilinin indirgeyici olmayan ucu üzerine etki eder ve kitin zincirinden tek tek diasetilkitobiyozun salınımını katalize eder. Bu reaksiyonda monosakkarit veya disakkarit salınımı meydana gelmemektedir. β -1,4-*N*-asetilglukosaminidazlar (NAGase) ise endokitinazlarda meydana gelen multimerik ürünleri GlcNAc (N-asetilglukozamin) monomerlerine parçalarlar. Özetle ekzokitinazlar kitini kitobiosidazlar yoluyla dimerlere, β -1,4-*N*-asetilglukosaminidazlar yoluyla monomerlerine ayırır (Hamid ve ark., 2013).

Kitinaz enzimlerinin aminoasit sekanslarına göre sınıflandırılması

Kitinazlar glikozil hidrolazlar (GH) grubunda bulunmaktadır. Glikozil hidrolazlar aminoasit sekanslarına göre 18, 19, 20 olmak üzere üç ailede gruplandırılmaktadır. Bu gruplandırmalar birincil yapılara göre yapılmıştır. Aynı ailede bulunan enzimlerin substratlara olan spesifitesinin ve girdikleri reaksiyonlardaki atomların bağlanma şekillerinin benzer özellik gösterdiği bilinmektedir. 18 GH ve 19 GH aileleri genellikle aynı kaynaklardan izole edilmiş olmasına karşın birbirinden farklı katalitik mekanizmalara ve üç boyutlu yapılara sahiptirler.

Bu üç glikozil hidrolaz ailesinde gruplanmış olan kitinazlardan GH18 ailesinde bulunanlar; Mantar, virüs, hayvan, bakteri ve bazı bitki kitinazlarını içermektedir. GH19 ailesinde bulunanlar; Bakteri (*Streptomyces*) ve esas olarak bitki kitinazları içermektedir. GH20 ailesinde bulunan kitinazlar ise; bakteri kaynaklı N- asetilglukoaminidazları ve insan kaynaklı N- asetilheksoaminidazları içermektedir (Patil ve ark., 2000; Yılmaz, 2019).

Kitinaz enzimlerinin gen dizilerine göre sınıflandırılması

Kitinazların gen sekansları bilindiği için gen dizilerine görede sınıflandırma yapılmıştır ve bu sınıflandırmada kitinazlar altı farklı gruba ayrılmıştır.

Gen dizilerine göre sınıflandırmada dikkate alınan karakteristik faktörler;

- Enzimin gen dizisine bağlanarak gen kaydını başlatan özel molekülleri (indükleyicileri)
- Enzimin net yükünün sıfır olduğu ve elektriksel alanda hareket etmediği pH değeri (izoiyonik nokta),
- Enzimin amino terminal (N terminal) dizisi,
- Enzimin lokasyonu,
- Sinyal peptidi (Patil ve ark., 2000; Yılmaz, 2019)

2.3.4.Kitinaz enziminin kullanım alanları

- Zararlı ve böceklerin popölasyonlarının kontrol edilmesinde,
- Biyouyumlu ve biyobozunur malzemelerin (suni deri, kontakt lens, cerrahi dikiş iplikleri) üretilmesinde,
- Mantar kaynaklı hastalıkların tedavisinde,
- İnsanlar üzerinde etkili ilaçlarda,
- Tek hücre proteini üretiminde,
- Atık yönetiminde,
- Kitin kalıntılarının biyolojik olarak gübreye dönüştürülmesinde,
- Tohum çimlenmesi gerçekleştiği sırada meydana gelen patojenik enfeksiyonun azaltılmasında yani bitki savunmasında serbest ya da immobilize formda kullanılabilmektedirler.

Kitinazların gelecekte raf ömrünü uzatacak gıda katkı maddeleri olarak, astım ve rinosinüzit gibi hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde terapötik ajan olarak ve tümör önleyici ilaçlarda etken madde olarak kullanılması planlanmaktadır (Patil ve ark., 2000; Yılmaz, 2019).

3.MATERYAL ve METOD

3.1.Materyal

Bu araştırmada kullanılan bakteri suşları Almus baraj glnden izole edilmiştir. Çeşitli besiyerleri, tamponlar, kimyasallar, spektrofotometre, santrifüj, vokteks, etüv, shaker, inkübatör ve bazı diğerk ekipmanlar kullanılmıştır.

3.1.1.Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların izole edileceği toprak rnekleri

Toprak rnekleri Tokat'ın Almus ilçesinde yer alan Almus Baraj Gölü'nn farklı bölgelerinden su tabanından toplanıp, uygun koşullar altında izolasyon çalışması yapılmak üzere Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirildi. Getirilen rnekler +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi.

3.1.2.Çalışmada kullanılan matriks karışımı

Almus baraj glnden alınan toprak örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar, Prof. Dr. İsa KARAMAN tarafından hazırlanan matriks karışımı içerisine 50 µL olarak 1.5 ML' lik eppendorflara yüklenerek stoğa alınıp muhafaza edildi.

3.1.3.Çalışmada kullanılan besiyerleri

NA Besiyeri (Nutrient Agar)

<u>Bileşimi</u>	<u>g /L</u>
Pepton from meat	5.0 g/L
Meat Extract	3.0 g/L
Agar-agar	12.0 g/L

Bileşimi yukarıdaki gibi olan toz NB besiyerinden 1 litre hazırlamak için 8 g/L tartıldı. Tartılan NB içerisinde 1 litre distile su bulunan erlenmayere ilave edildi. İçerisine manyetik balık atıldıktan sonra homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Homojen hale geldikten sonra manyetik balık tutucu yardımı ile manyetik balık çıkarıldı ve her birinin hacmi 30 ML olacak şekilde falkonlara aktarıldı (Falkonların kapakları otoklava koyarken tam olarak kapatılmayacak, otoklavdan çıktıktan sonra sıkıca kapatılacaktır.). Falkonlar 4' lü 5' li gruplar halinde erlenmayerlerin içerisine yerleştirilip steril hale gelmesi için otoklava konuldu (121 °C 1.2 atm 15 dk). Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan otoklavın sıcaklığı 45-50 °C' ye geldiğinde besiyeri otoklavdan çıkarıldı (Hazırlanan besiyerinin pH' ı 25 °C' de 7.0± 0.2' dir.). NB besiyeri, katı besiyerlerine ekimi ve matriks karışımına stoğa alınması işlemlerinden önce mikroorganizmaların geliştirilmesi ve seyreltilmesi için kullanıldı.

MHA Besiyeri (Muller- Hinton Agar)

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Meat infusion	2.0 g/L
Casein hydrolysate	17.5 g/L
Starch	1.5 g/L
Agar-agar	13.0 g/L

Bileşimi yukarıdaki gibi olan toz MHA besiyerinden 1 litre hazırlamak için 34 g/L tartıldı. Tartılan MHA içerisinde 1 litre distile su bulunan erlenmayere ilave edildi. İçerisine manyetik balık atıldıktan sonra homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcıda ısıtılarak karıştırıldı. Homojen hale geldikten sonra manyetik balık tutucu yardımı ile manyetik balık çıkarıldı ve erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp steril hale gelmesi için otoklava konuldu (121 °C 1.2 atm 15 dk). Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan otoklavın sıcaklığı 45-50 °C' ye geldiğinde besiyeri otoklavdan çıkarıldı. Steril kabine alınan besiyeri bek alevinin yanında her bir petri için 20 ML olacak şekilde dökülerek soğumaya bırakıldı (Hazırlanan besiyerinin pH' ı 25 °C' de 7.4± 0.2' dir.). MHA besiyeride NA besiyeri gibi toprak örnekleri içerisindeki mikroorganizmaların üretilmesi için kullanıldı. Fakat MHA besiyeri bakterilerin üremesi için daha zengin bir besi ortamı sağladığından dolayı bakterileri saflaştırırken MHA besiyeri tercih edildi.

NB Besiyeri (Nutrient Broth)

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Peptone from meat	5.0 g/L
Meat extract	3.0 g/L

Bileşimi yukarıdaki gibi olan toz NB besiyerinden 1 litre hazırlamak için 8 g/L tartıldı. Tartılan NB içerisinde 1 litre distile su bulunan erlenmayere ilave edildi. İçerisine manyetik balık atıldıktan sonra homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Homojen hale geldikten sonra manyetik balık tutucu yardımı ile manyetik balık çıkarılmış ve her birinin hacmi 30 ML olacak şekilde falkonlara aktarıldı (Falkonların kapakları otoklava koyarken tam olarak kapatılmayacak, otoklavdan çıktıktan sonra sıkıca kapatılacaktır.). Falkonlar 4' lü 5' li gruplar halinde erlenmayerlerin içerisine yerleştirilip steril hale gelmesi için otoklava konuldu (121 °C 1.2 atm 15 dk). Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan otoklavın sıcaklığı 45-50 °C' ye geldiğinde besiyeri otoklavdan çıkarıldı (Hazırlanan besiyerinin pH' ı 25 °C' de 7.0± 0.2' dir.). NB besiyeri, katı besiyerlerine ekimi ve matriks karışımına stoğa alınması işlemlerinden önce mikroorganizmaların geliştirilmesi ve seyreltilmesi için kullanıldı.

M9 Medium

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0.815 g/L
KH ₂ PO ₄	1.5 g/L
NaCl	0.25 g/L
NH ₄ Cl	0.5 g/L
MgSO ₄	0.12 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.007 g/L

(Wen ve ark., 2002)

1 litre M9 Medium hazırlamak için yukarıda belirtilen kimyasallar belirtilen oranlarda tartıldı. Tartılan kimyasallar 1 litre distile su bulunan erlenmayere ilave edildi. İçerisine manyetik balık atıldıktan sonra homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Homojen hale geldikten sonra manyetik balık tutucu yardımı ile manyetik balık çıkarıldı ve erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp steril hale gelmesi için otoklava konuldu (121 °C 1.2 atm 15 dk). Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan soğumaya bırakıldı (Hazırlanan besiyerinin pH' ı 25 °C' de 7.4± 0.2' dir.). M9 Medium çeşitli aminoasitler ve karbon kaynakları ile desteklenebilen bakteri kültürleri için zengin içerikli bir besi ortamıdır.

CHDA Agar (Chitinase- Detection Agar)

<u>Bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0.815 g/L
KH ₂ PO ₄	1.5 g/L
NaCl	0.25 g/L
NH ₄ Cl	0.5 g/L
MgSO ₄	0.12 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.007 g/L
Colloidal chitin	10 g/L
Agar-agar	20 g/L

(Wen ve ark., 2002; Kuzu ve ark., 2012)

CHDA Agar , M9 medium karışımına 10 g koloidal kitin ve 20 g agar eklenmesi ile elde edilmektedir. 1 litre CHDA hazırlamak için yukarıda belirtilen kimyasallar belirtilen oranlarda tartıldı. Tartılan kimyasallar 1 litre distile su bulunan erlenmayere ilave edildi. İçerisine manyetik balık atıldıktan sonra homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcıda ısıtılarak karıştırıldı. Homojen hale geldikten sonra manyetik balık tutucu yardımı ile manyetik balık çıkarıldı ve erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp steril hale gelmesi için otoklava konuldu (121 °C 1.2 atm 15 dk). Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan otoklavın sıcaklığı 45-50 °C' ye geldiğinde besiyeri otoklavdan çıkarıldı. Steril kabine alınan besiyeri bek alevinin yanında her bir petri için 20 ML olacak şekilde dökülerek soğumaya bırakıldı (Hazırlanan besiyerinin pH' ı 25 °C' de 6.5± 0.2' dir.). Mikroorganizmalardaki kitinaz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanıldı.

SDB (Sabouraud %2 Dextrose Broth)

Bileşimi	g/L
Peptone from meat	5.0 g/L
Peptone from casein	5.0 g/L
D(+) Glucose	20 g/L

1 litre SDB hazırlamak için yukarıda belirtilen kimyasallar belirtilen oranlarda tartıldı. Tartılan kimyasallar 1 litre distile su bulunan erlenmayere ilave edildi. İçerisine manyetik balık atıldıktan sonra homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Homojen hale geldikten sonra manyetik balık tutucu yardımı ile manyetik balık çıkarıldı ve erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp steril hale gelmesi için otoklava konuldu (121 °C 1.2 atm 15 dk). Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan soğumaya bırakıldı (Hazırlanan besiyerinin pH' ı 25 °C' de 5.6 ± 0.2 ' dir.). SDB, dekstrozu konsantrasyonu ve pH asitliği sayesinde maya, fungus ve asidik mikroorganizmaların yetiştirilmesi için kullanılmaktadır.

Kitin İçerikli LB Besiyeri (Luria- Bertani Broth)

Bileşimi	g/L
Yeast extract	5 g/L
Trypton	10 g/L
NaCl	5 g/L
Colloidal chitin	10 g/L

(Wen ve ark., 2002)

Bileşimi yukarıdaki gibi olan kitin içerikli LB besiyerinden 1 litre hazırlamak için belirtilen kimyasallar belirtilen orenlarda tartıldı. Tartılan kimyasallar, içerisinde 1 litre distile su bulunan erlenmayere ilave edildi. İçerisine manyetik balık atıldıktan sonra homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Homojen hale geldikten sonra manyetik balık tutucu yardımı ile manyetik balık çıkarıldı ve her birinin hacmi 5 ML olacak şekilde falkonlara aktarıldı (Falkonların kapakları otoklava koyarken tam olarak kapatılmayacak, otoklavdan çıktıktan sonra sıkıca kapatılacaktır.). Falkonlar 4' lü 5' li gruplar halinde erlenmayerlerin içerisine yerleştirilip steril hale gelmesi için otoklava konuldu (121  C 1.2 atm 15 dk). Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan otoklavın sıcaklığı 45-50  C' ye geldiğinde besiyeri otoklavdan çıkarıldı (Hazırlanan besiyerinin pH' ı 25  C' de 7.0± 0.2' dir.). Luria- Bertani Broth birçok bakteri türünün büyümesi için hızlı ve zengin bir besi ortamıdır. Bu deneyde kısmi enzim saflaştırmasının ilk aşamasında kitinaz aktivitesi yüksek olduğu belirlenen bakteri kültürlerinin yetiştirilmesi için kitin içerikli LB besiyeri kullanıldı.

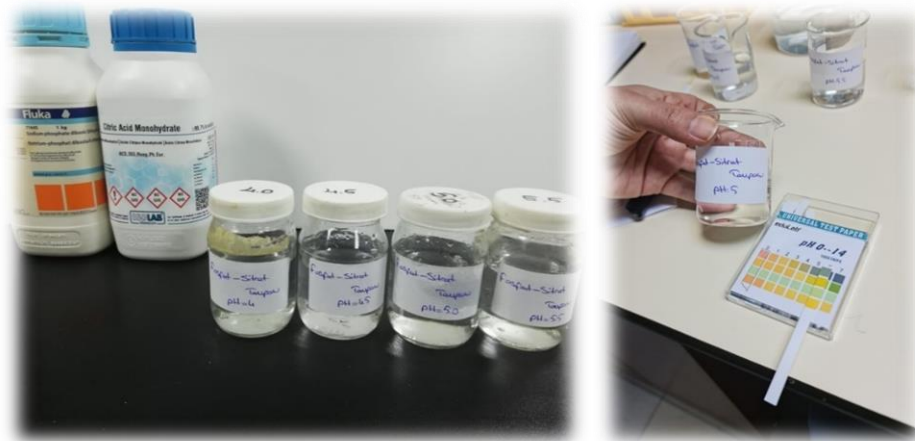
3.1.4.Çalışmada kullanılan tampon çözeltiler

Fosfat- Sitrat Tamponu (0.2M)

pH Değeri	pH 4.0	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5
Bileşimi	g/100 ML	g/100 ML	g/100 ML	g/100 ML
Na_2HPO_4	1.36 g	1.56 g	1.83 g	2.06 g
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	1.29 g	1.17 g	1.02 g	0.89 g

Çizelge 3.1. Fosfat- Sitrat Tamponu Hazırlanması (Anonim, 2007)

pH 4.0- 5.5 aralığı için kullanılan tampondur. pH' ları 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 olan 4 farklı pH' da çözelti hazırlandı. Bileşimde belirtilen Na_2HPO_4 ve $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 50 ML distile su içerisine farklı pH' lar için belirtilen miktarlarda tartılarak eklendi. pH ölçümü yapıldıktan sonra hacim 100 ML' ye tamamlandı. pH ayarlaması işlemi için HCl ve NaOH kullanıldı.



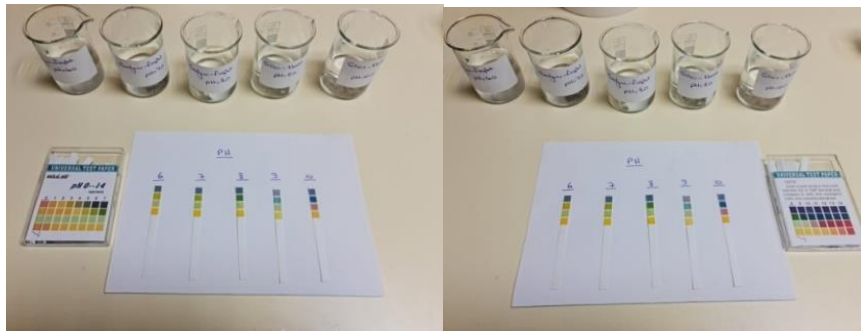
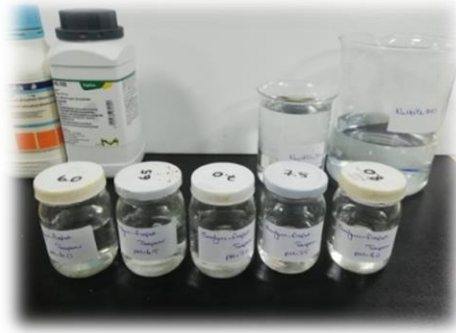
Şekil 3.1. Fosfat-Sitrat tamponu

Sodyum- Fosfat Tamponu (0.2M)

Bileşimi	g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	35.61 g/L
NaH_2PO_4	27.6 g/L

Çizelge 3.2. Sodyum-Fosfat Tamponunun Hazırlanması (Anonim, 2007)

pH 6.0- 8.0 aralığı için kullanılan tampondur. PH' ları 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 olmak üzere 5 farklı pH' da çözelti hazırlandı. Bileşimde belirtilen kimyasallar 1' er litre hazırlandı ve sonra $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'den 77 ML, NaH_2PO_4 'den 23 ML olacak şekilde 50 ML çözelti hazırlandı ve pH ölçümü yapıldıktan sonra hacim 100 ML' ye tamamlandı. pH ayarlaması işlemi için H_3PO_4 ve NaOH kullanıldı.



Şekil 3.2. Sodyum-Fosfat tamponu

Glisin- NaOH Tamponu (0.2M)

pH Değeri	pH 8.5	pH 9.0	pH 9.5	pH 10.0	Ph 10.5
Bileşimi	g/100 ML	g/100 ML	g/100 ML	g/100 ML	g/100 ML
C ₂ H ₅ NO ₂	1.5 g	1.5 g	1.5 g	1.5 g	1.5 g
NaOH	0.06 g	0.14 g	0.27 g	0.51 g	0.62 g

Çizelge 3.3. Glisin-NaOH Tamponunun Hazırlanması (Anonim, 2007)

pH 8,5- 10,5 aralığı için kullanılan tampondur. pH' ları 8.5, 9.0, 9.5, 10.0,10.5 olan 5 farklı pH' da çözelti hazırlandı. Bileşimde belirtilen C₂H₅NO₂ ve NaOH 50 ML distile su içerisine farklı pH' lar için belirtilen miktarlarda tartılarak eklendi. pH ölçümü yapıldıktan sonra son hacim 100 ML' ye tamamlandı. pH ayarlaması işlemi için HCl ve NaOH kullanıldı.



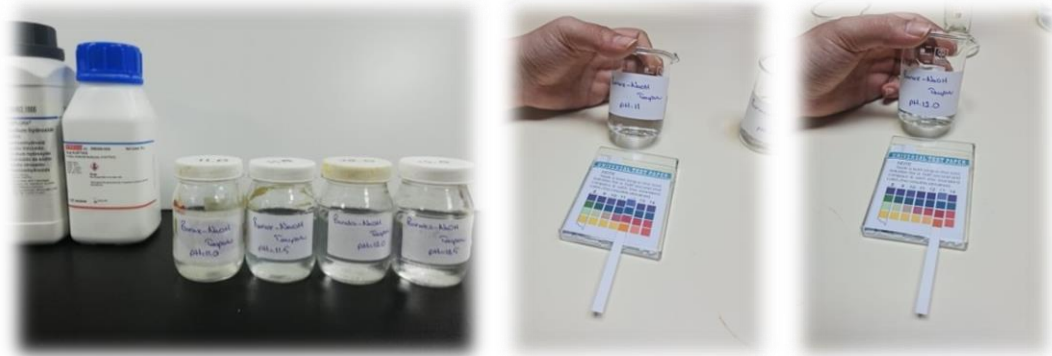
Şekil 3.3. Glisin-NaOH tamponu

Boraks- NaOH Tamponu (0.2M)

pH Değeri	pH 11.0	pH 11.5	pH 12.0	pH 12.5
Bileşimi	g/100 ML	g/100 ML	g/100 ML	g/100 ML
$\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	2.12 g	2.12 g	2.12 g	2.12 g
NaOH	1.38 g	2.02 g	2.34 g	2.98 g

Çizelge 3.4. Boraks-NaOH Tamponunun Hazırlanması (Anonim, 2007)

pH 11- 12.5 aralığı için kullanılan tampondur. pH' ları 11.0, 11.5, 12.0, 12.5 olan 4 farklı pH' da çözelti hazırlandı. Bileşimde belirtilen $\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ve NaOH 50 ML distile su içersine farklı pH' lar için belirtilen miktarlarda tartılarak eklendi. pH ölçümü yapıldıktan sonra son hacim 100 ML' ye tamamlandı. pH ayarlaması işlemi için HCl ve NaOH kullanıldı.



Şekil 3.4. Boraks-NaOH tamponu

3.1.5.DNS çözeltisi

1 g DNS 50 ML distile su içerisinde çözöldü. Üzerine 20 ML, 2 M NaOH ve 30 g K- Na Tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ilave edildi. Son hacim tekrardan distile su ile 100 ML' ye tamamlandı (Miller, 1959).

3.1.6.Çalışmada kullanılan fungus türleri

- *Aspergillus flavus*
- *Aspergillus niger*
- *Phoma tracheiphila*

3.1.7.İnce tabaka kromatografisi (TLC) için kullanılan solüsyonlar

- Bütanol: Asetik Asit: Su (6:2:2)
- Kloroform: Asetik Asit: Su (6:7:1)
- Bütanol: Metanol: Amonyak: Su (5:4:2:1)

(Kim ve ark., 1995; Singh ve ark., 2004; Ghebregzabher ve ark., 1976)

3.1.8.Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri

Yapılan deneylerde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri;

- Class 2 steril kabin
- Otoklav cihazı (hirayama)
- Manyetik karıştırıcı
- UV-VIS spektrofotometre (shimadzu uvmini-1240)
- Spektrofotometre küvetleri
- Vorteks
- Santrifüj
- Etüv
- Thermoshaker
- pH metre
- Su banyosu (memmert)
- Aerobik inkübatör (memmert)
- Buzdolabı
- Derin dondurucu
- Dijital hassas terazi (presica)
- Plastik ve cam petri kapları
- Cam tüpler
- Eppendorf falkon tüpleri
- Metal öze
- Beher
- Erlenmayer
- Eppendorf tüpler
- Cam huni
- Metal spatül
- Tahta spatül
- Pens
- Bek alevi

- Tartım kapları
- Distile su
- Cam pipet
- Otomatik pipetler (10-100 μ l ,100-1000 μ l)
- Pipet uçları
- Alüminyum
- Makas
- Asetat kalemi
- Eldiven
- Otoklav bandı
- Silica Gel F254 25 Tlc Aluminium Sheets (20×20)
- 1 μ L' lik şırınga
- Penset

3.2. Metot

3.2.1. Toprak örneklerinin toplanması

Toprak örnekleri için Tokat' ın Almus ilçesinde yer alan Almus Baraj Gölü'nün bulunduğu alan gezilerek örnek alınacak lokasyonlar belirlendi. Toplama aşamasında toprak örneklerinde bulunan yabancı materyaller dikkatlice temizlendi. Örnekler;

Örnek 1- 2: Çamur Altı

Örnek 9: Kaya Dibi- Çamur Yüzeyi

Örnek 3: Çamur Yüzeyi

Örnek 10: Kaya Arası

Örnek 4, 5, 6, 7: Kaya Dibi

Örnek 11: Kaya Yüzeyi

Örnek 8: Çamur Yüzeyi

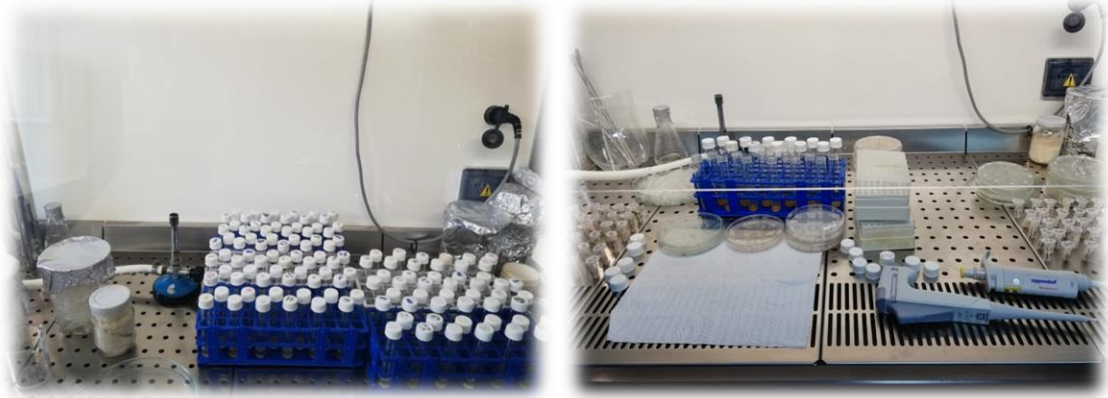


Şekil 3.5. Toprak örneklerinin toplanması

olmak üzere 11 farklı lokasyondan toplandı ve önceden etiketlenmiş ve steril edilmiş olan stok şişelerine konuldu. İzolasyon çalışması için laboratuvara getirilen örnekler, +4 °C' de buzdolabında saklandı.

3.2.2. Toprak örneğinden elde edilen bakterilerin saflaştırılması, matriks karışımı ile stoğa alınması ve saklanması

Her bir örneğe ayrı ayrı seri dilüsyon yapıldı. 10^{-10} 'a kadar seyreltilen toprak örneklerinin seyreltilmesi sırasında, bakterileri turgor basıncı sebebiyle kaybetmemek adına, örneklerin her birinin sırayla dilüsyonlarının yapılmasına dikkat edildi. Seyreltilen örnekler 24- 48 saat aerobik inkübatörde 37 °C' de bekletildi. İnkübatörden çıkarılan örnekler NA besiyerine yayma ekim metodu ile ekildi. 24 saat inkübatörde bırakıldıktan sonra agar plaklarda gelişen farklı kolonilerin her biri MHA' a ayrı ayrı ekildi. Saf hale getirilen bakteri kolonilerinin her biri 1' er ML NB içerisine inoküle edildi ve vaktekslenerek iyice karışması sağlandı. Ardından Prof. Dr. İsa KARAMAN tarafından hazırlanan ve steril edilmiş olan matriks karışımı, steril eppendorf tüplerine 0.5 g olacak şekilde aktarıldı. Matriks karışımının bulunduğu eppendorflara NB besiyerinde bekletilen bakteri kültürlerinden 60 µL mikropipet yardımı ile damlatılarak stoğa alındı. Stokların her birine ' B' harfi ile B-1, B-2, B-3, ... şeklinde etiketleme yapıldı.

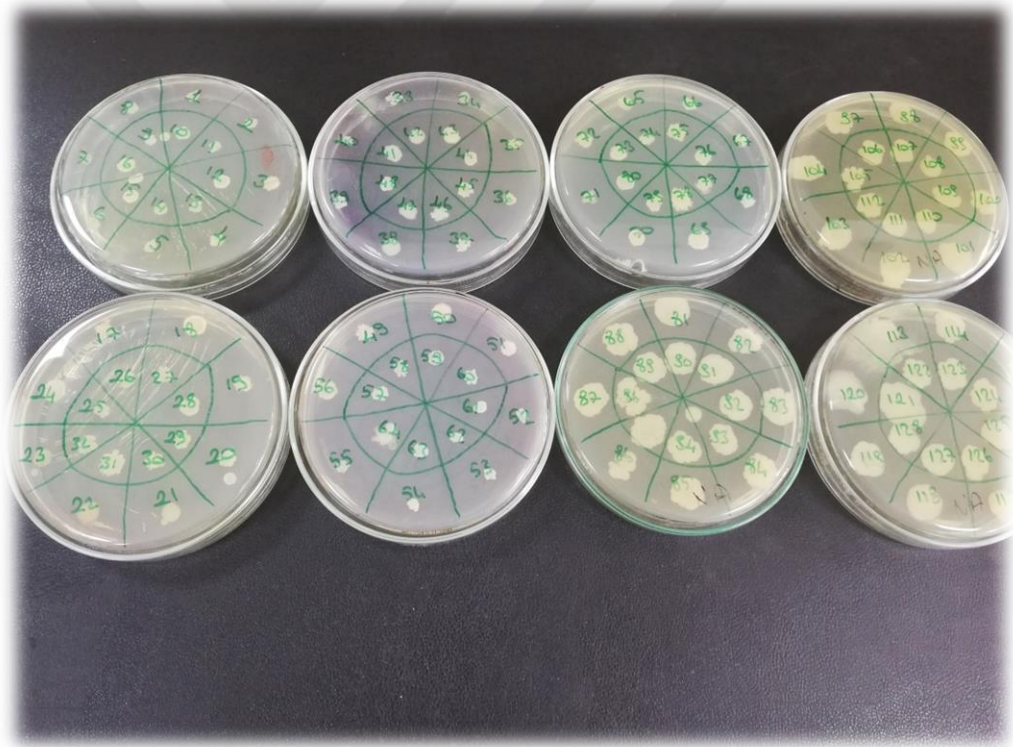


Şekil 3.6. Örneklerin stoğa alınması

3.2.3.Stokların yenilenmesi ve kontrolü

Eppendorflarda bulunan stok kültürleri steril kabine alındı. Her bir stok için bir durham tüpü etiketlendi ve içerisine 1 ML NB eklendi. Steril tahta spatül ile 1 ML NB içerisine stok kültüründen eklendi ve vortekslendikten sonra MHA besiyerine 5 µl damlatıldı.

16 farklı bakteri ekimi yapılabilecek şekilde petri kaplarının çizimleri yapıldı ve damlatma metodu ile ekim yapıldı. Her bakteri üreme gösterdiği için bakterilerin stoğa alınması veya stokların muhafaza edilmesi sırasında bir problem olmadığı tespit edildi ve deneylere devam edildi.



Şekil 3.7. Stoklardan alınan örneklerin damlatma metodu ile ekimi

3.2.4. Standart kolloidal kitinin hazırlanması

5 g kitin mixerden geçirilerek toz haline getirildi ve 60 ML HCl' e yavaşça ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra çalkalamalı inkübatörde +4 °C' de 24 saat yüksek devirde (400 dk/devir) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra karışımın içerisine 2 L (% 95' lik) soğuk etanol eklendi ve 25 °C' de 24 saat bekletildi. Karışım 5000 rcf' de 20 dk +4 °C' de santrifüj edilerek oluşan presipitat (çökelti) toplandı. Elde edilen presipitat kaba filtre kâğıdı (Whatmann, 5) üzerine konuldu ve ph değeri 7 oluncaya kadar steril distile su ile yıkama yapıldı (Wen ve ark., 2002; Kuzu ve ark., 2012).

$$RCF= 1.12 \times r \times (rpm/ 1000)^2$$

(rcf= Rölatif santrifüj kuvveti, rpm= dakikadaki devir sayısı, r= rotor yarıçapı)

$$= 1.12 \times 100 \times (rpm)^2 / (1000)^2$$

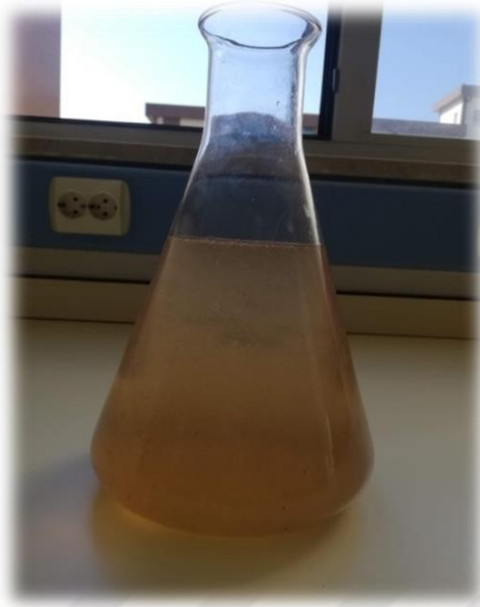
$$= 500/112 \times (1000)^2 = (rpm)^2$$

$$44.642.857 = (rpm)^2$$

$$Rpm= 6681$$

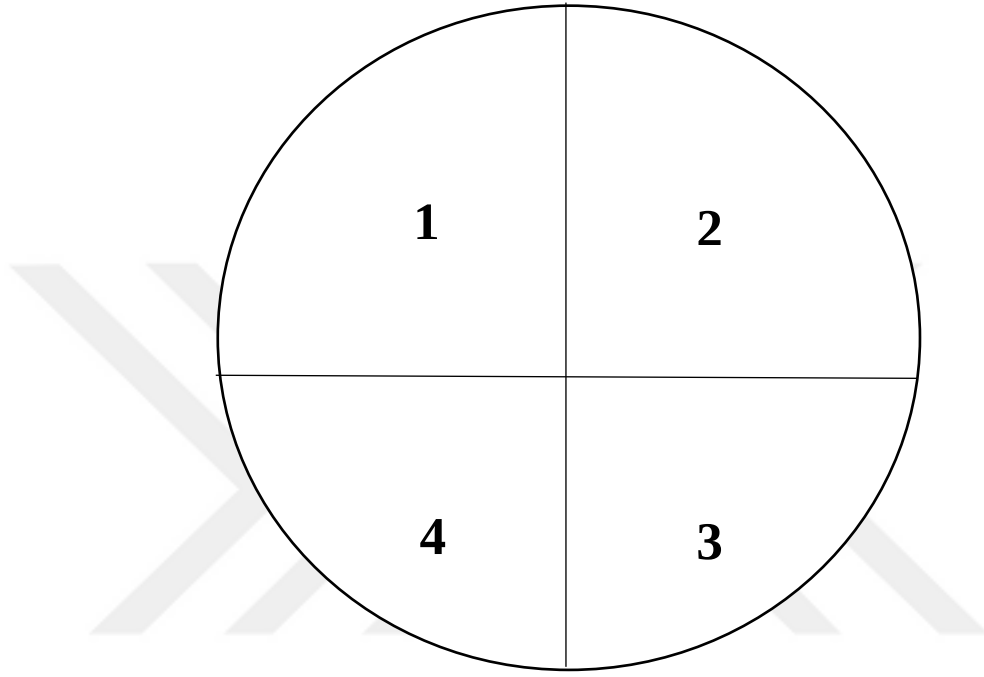
5000 rcf $\cong$ 6681 rpm olduğu için,

20 dk olan santrifüj süresini 6000 rpm için 30 dk' ya çevirerek uygulandı.



Şekil 3.8. Kolloidal kitin hazırlanması

3.2.5. Standart koloidal kitin kullanılarak hazırlanan chda agarda kitinaz üreten bakteri suşlarının tespit edilmesi



Şekil 3.9. Kullanılan petri kaplarının bölünmesi

Petri kapları şekildeki gibi 4 bölüme ayrıldı ve numaralandırıldı. 130 farklı bakteri için daha önceden hazırlanmış olan stok kültürleri steril kabine alındı. Her bir stok için bir durham tüpü etiketlendi ve içerisine 1 ML NB eklendi. Steril tahta spatül ile 1 ML NB içerisine stok kültüründen eklendi ve vortekslendi. Daha sonra CHDA besiyerine iğne öze yardımıyla batırma kültürü yöntemiyle ekimleri yapıldı. 37 °C’ de 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu bakterilerin clear zone oluşturup oluşturmadığı gözlemlendi ve oluşan clear zone çapları ölçüldü (Asmani ve ark., 2020).

3.2.6.Böcek ekzo iskeletleri (crab shells) kullanarak koloidal kitin hazırlanması

Böcek ekzo iskeletlerinden oluşan kitinden koloidal hazırlanması standart kitinden koloidal kitin hazırlanması protokolü ile aynıdır. Sadece kullanılan miktarda farklılık vardır. Böcek ekzo iskeletlerinden oluşan kitin mixerden geçirilerek toz haline getirildi ve tartıldı. Total ağırlık 2.5 g olarak belirlendikten sonra tartılmış olan kitin 30 ML HCl'e yavaşça ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra çalkalamalı inkübatörde +4 °C' de 24 saat yüksek devirde (400 dk/devir) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra karışımın içerisine 1 L (%95' lik) soğuk etanol eklendi ve 25 °C' de 24 saat bekletildi. Karışım 5000 rcf' de 20 dk +4 °C' de santrifüj edilerek oluşan presipitat (çökelti) toplandı. Elde edilen presipitat kaba filtre kâğıdı (Whatmann, 5) üzerine konuldu ve ph değeri 7 oluncaya kadar steril distile su ile yıkama yapıldı (Wen ve ark., 2002; Kuzu ve ark., 2012).

3.2.7.Böcek ekzo iskeletleri (crab shells) kullanılarak hazırlanan chda agarda kitinaz üreten bakteri suşlarının tespit edilmesi

Böcek ekzo iskeletlerinden elde edilen koloidal kitin ile hazırlanan CHDA Agar' da petri kapları yine 4 bölüme ayrıldı ve numaralandırıldı. 130 farklı bakteri için daha önceden hazırlanmış olan stok kültürleri steril kabine alındı. Her bir stok için bir durham tüpü etiketlendi ve içerisine 1 ML NB eklendi. Steril tahta spatül ile 1 ML NB içerisine stok kültüründen eklendi ve vortekslendi. Daha sonra CHDA besiyerine iğne öze yardımıyla batırma kültürü yöntemiyle ekimleri yapıldı. 37 °C' de 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu bakterilerin clear zone oluşturup oluşturmadığı gözlemlendi ve oluşan clear zone çapları ölçüldü (Asmani ve ark., 2020).

3.2.8.Fungal hifler kullanılarak koloidal kitin hazırlanması

Sabauraud %2 Dextrose Broth her bakteri için 1 L olacak şekilde (30 g) toplam 3 L hazırlandı. Çalkalamalı inkübatöre sığacak boyutta erlenlere yerleştirilmeden önce manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Sonrasında:

- 1.Fungus ‘‘ Aspergillus flavus’’ için;

Dört tane 500 ML erlen şişesine 250’ şer ML olacak şekilde paylaştırıldı.

- 2. Fungus ‘‘ Aspergillus niger’’ için;

Dört tane 500 ML erlen şişesine 250’ şer ML olacak şekilde paylaştırıldı.

- 3. Fungus ‘‘ Phoma tracheiphila’’ için;

İki tane 500 ML erlen şişesine 250’ şer ML, dört tane 250 ML erlen şişesine 125’ er ML olacak şekilde paylaştırıldı.

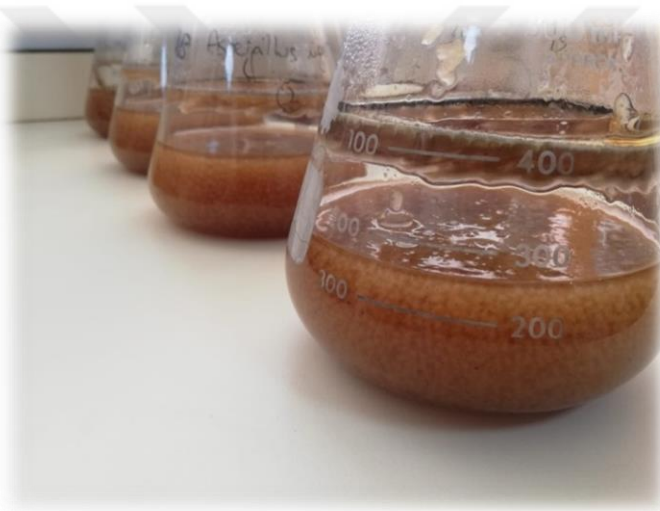
Bu şekilde çalkalamalı inkübatöre sığacak şekilde planlanma yapıldı. Funguslar inoküle edildikten sonra 120 rpm’ de 30 °C 48 ila 72 saat inkübasyona bırakıldı (Duan ve ark., 2009; Castrejon-Antonio ve ark., 2020; Wen ve ark., 2002).



Şekil 3.10. SDB içerisine fungusların inoküle edilmesi



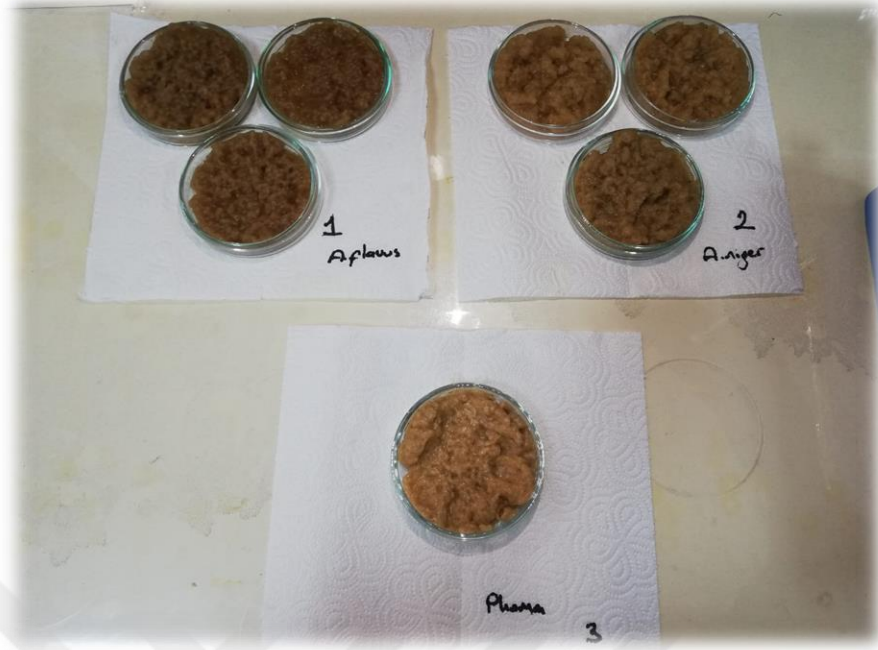
Şekil 3.11. *Aspergillus flavus* hifleri
kullanılarak hazırlanan kolloidal kitin



Şekil 3.12. *Aspergillus niger* hifleri
kullanılarak hazırlanan kolloidal kitin



Şekil 3.13. *Phoma tracheiphila* hifleri
kullanılarak hazırlanan kolloidal kitin



Şekil 3.14. Fungusların filtre edildikten sonraki görüntüsü

Çalkalamalı inkübatörde 72 saat inkübasyon süresini tamamlayan 3 fungus örneği inkübatörden çıkarılıp Whatmann kağıdında süzüldükten sonra petri kaplarına konuldu ve etüve yerleştirildi. 40 °C’ de kuruyana kadar etüvde bekletildi. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra funguslar blenderdan geçirildi ve falkonlara konuldu.

Falkonlardaki funguslar;

1.falkon: *Aspergillus niger* + *Aspergillus flavus*

2.falkon: *Aspergillus flavus*+ *Phoma tracheiphila*

3.falkon: *Aspergillus niger*+ *Aspergillus flavus*+ *Phoma tracheiphila*

Fungus karışımlarından 2,5 g tartıldı ve falkonlara konuldu. Üç farklı falkona hazırlanmış olan fungus karışımlarının her biri 30 ML HCl' e yavaşça ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra çalkalamalı inkübatörde +4 °C' de 24 saat yüksek devirde (400 dk/devir) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra karışımın içerisine 1 L (% 95' lik) soğuk etanol eklendi ve 25 °C' de 24 saat bekletildi. Karışım 5000 rcf' de 20 dk +4 °C' de santrifüj edilerek oluşan presipitat (çökelti) toplandı. Elde edilen presipitat kaba filtre kâğıdı (Whatmann,5) üzerine konuldu ve ph değeri 7 oluncaya kadar steril distile su ile yıkama yapıldı (Wen ve ark., 2002).

3.2.9.Fungal hifler kullanılarak hazırlanan chda agarda kitinaz üreten bakteri suşlarının tespit edilmesi

Fungal hifler kullanılarak elde edilen koloidal kitin ile hazırlanan CHDA Agar' da petri kapları yine 4 bölüme ayrıldı ve numaralandırıldı. 130 farklı bakteri için daha önceden hazırlanmış olan stok kültürleri steril kabine alındı. Her bir stok için bir durham tüpü etiketlendi ve içerisine 1 ML NB eklendi. Steril tahta spatül ile 1 ML NB içerisine stok kültüründen eklendi ve vortekslendi. Daha sonra CHDA besiyerine iğne öze yardımıyla batırma kültürü yöntemiyle ekimleri yapıldı. 37 °C' de 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu bakterilerin clear zone oluşturup oluşturmadığı gözlemlendi ve oluşan clear zone çapları ölçüldü (Asmani ve ark., 2020).

3.2.10.Kitinaz enziminin kısmi saflaştırılması

Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu belirlenen bakteriler yeniden stoktan alındı. Nutrient broth' da çoğaltılan bakteriler nutrient agara 4 fazlı ekim metodu ile ekildi ve inkübatörde 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Saf olup olmadığı tekrardan kontrol edilen bakteriler inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra parafilm ile sarıldı ve buzdolabında +4 °C' de muhafaza edildi.

Kitinli LB Besiyeri protokole uygun olarak hazırlandıktan sonra her bir bakteri için kitinli lb besiyerinden durham tüplerine 5 ML konuldu ve bu 5 ML besiyerinin içine bakteriler inoküle edildi. Etiketlemesi yapılan tüpler beherlerin içine konulduktan sonra çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi.

37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılan bakterilerin inkübasyon süresi bitinceye kadar yine protokole uygun olarak her bir bakteri için 500 ML olacak şekilde % 1 kitinli m9 besiyeri hazırlandı. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra 5 ml Kitinli LB besiyeri içerisine inoküle edilmiş olan bakteriler 500' er ML % 1 kolloidal kitinli M9 Medium' unun içerisine aktarıldı. İnkübatöre yerleştirildikten sonra 37 °C' de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Üç günlük inkübasyon süresinin sonunda bakteri kültürleri 15000 devir/dk ve +4 °C' de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatantları alındı (Folders ve ark., 2000; Kuzu ve ark., 2012).

$$RCF= 1.12 \times r \times (rpm/1000)^2$$

$$15000 \text{ rcf ve } 20\text{dk} = 11500 \text{ rpm ve } 20\text{dk}$$

$$= 6000\text{rpm ve } 38\text{dk}$$

Süpernatant kaba filtre kâğıdı (Whatmann 5) ile süzüldü ve üzerine hacminin % 70' i kadar soğuk % 95' lik etanol ilave edildi. Hafifçe çalkaladıktan sonra -18 °C' de 24 saat bekletildi.



Şekil 3.15. Kısmi enzim saflaştırma

Etil alkol eklenip $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 24 saat bekletilen bakteri süspansiyonu santrifüjlendi. Protokolde 10000 rpm 20 dk olarak belirtilen devir/dk max prm' i 6000 olan cihazımıza göre 30dk olarak revize edildi. Her bir bakteri süspansiyonu 6000 rpm'de 30 dk $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de santrifüj edildildi. Her bakterinin peletleri ayrı ayrı falkonlarda biriktirildi.

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \longrightarrow 141.96\text{ g/mol}$$

$$0.1\text{M} = n/v \longrightarrow v= 1 \quad \text{M}= 0.1$$

(M= molar konsantrasyon, n= çözünen maddenin mol hacmi, v= çözeltinin litresi)

$$\longrightarrow 141.96 \times 0.1$$

$$\longrightarrow 14.96\text{ g tart ve 1L' ye tamamla.}$$

$$1000\text{ml için} \quad 14.96\text{ g}$$

$$\underline{60\text{ml için}} \quad \underline{x\text{ g}}$$

$$X= 0.8517\text{ g}$$

Her bakteri süspansiyonu peleti için Na_2HPO_4 tamponu hazırlandı. pH ölçümü yapıldı. pH ayarlaması için HCl kullanıldı ve pH nötrlendi. pH nötr hale geldikten sonra peletler üzerine çözünene kadar tampon eklendi ve $+4\text{ }^\circ\text{C}$ de saklandı (Folders ve ark., 2000; Kuzu ve ark., 2012).

3.2.11. CHDA besiyerinde kitinaz aktivitesinin saptanması

Standart koloidal kitin ile protokole uygun olarak CHDA Agar hazırlandı. Etiketlemeleri yapıldıktan sonra CHDA Agar üzerinde durham tüpü ile kuyucuklar açıldı. Her bir bakteri için ayrı ayrı hazırlanmış olan bakteri+ tampon karışımından 1' er ML mikropipet yardımıyla kuyucuklara damlatıldı.



Şekil 3.16. CHDA besiyerinde durham tüpü ile açılan kuyucuklar

(kuyucuk çapı 14 cm)

Kuyucuklara bakteri+ tampondan oluşan karışımlar damlatıldıktan iki saat sonrasında itibaren 72 saat boyunca her 4 saatte bir kitinin hidrolizi (clear zone oluşumu) gözlemlendi ve sonuçlar tablo ve grafik haline getirildi (Kuzu, 2008).

3.2.12.Kitinaz aktivitesinin DNS ile saptanması

Kısmi saflaştırılmış enzim preparasyonlarından 0.5 ML ve substrat olarak kullanılan % 1' lik koloidal kitin+ tampon karışımından 0.5 ML bir durham tüpünde iyice karıştırıldıktan sonra 37°C' de 30 dk inkübe edildi. Ardından içlerine 1 ML DNS (Dinitrosalisilik asit) solüsyonu eklendi, 5 dk manyetik karıştırıcıda kaynar suyun içerisine konuldu ve kaynatıldı. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra tüplerin soğuması beklendi. Sonrasında 7000 rpm ve +4 °C' de, 30 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar temiz tüplere alındı. Blank (Kör) ile spektrofotometre sıfırlandı ve sonrasında 550 nm dalga boyuna ayarlanan spektrofotometre ile değerler okundu ve okunan değerler kaydedildi (Ferrari ve ark., 2014; Kuzu, 2008; Aygan, 2008).

Kullanılan tampon: 1 ML 0,2 M Sodyum- Fosfat Tamponu (pH =7)

3.2.13. Tlc kromotografisi

Tlc kağıdının uzunluğu: 8.2 cm ve genişliği: 4.6 cm olacak şekilde kesildi. Alt ve üst kısmından 1 cm olacak şekilde çizgiler çizildi. Sonrasında kullanılacak olan üç farklı solüsyon protokole uygun olarak hazırlandı ve solüsyonlar tankların içine aktarıldı.

1. Solüsyon; Bütanol: Asetik asit: Distile su (6:2:2)
2. Solüsyon; Kloroform: Asetik asit: Distile su (6:7:1)
3. Solüsyon; Bütanol: Metanol: Amonyak: Distile su (5:4:2:1)

(Kim ve ark., 1995; Singh ve ark., 2004; Ghebregzabher ve ark., 1976)

Tlc kâğıdı üzerine iki nokta işaretlendi ve aralarında 1 cm boşluk olacak şekilde bir nokta üzerine 5 µL % 4' lük glikoz, diğer işaretlenen nokta üzerine kısmi olarak saflaştırılmış olan B-98, B-123 ve B-124 numaralı enzimlerden 10 µL damlatıldı. Tamamen kuruduktan sonra tlc kağıtları tankın içine yerleştirildi (Arabacı, 2011).



Şekil 3.17. Kullanılan tlc tankı

Yaklaşık 35 dk sonra yani solüsyon belirlenen üst noktaya ulaştıktan sonra penset yardımıyla tanktan çıkarıldı ve kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra UV ışık altında sonuçlar gözlemlendi, rf değerleri hesaplandı ve sonuçlar kaydedildi.

3.2.14.Enzim aktivitesinin belirlenmesi için NAG standart grafiği oluşturulması

N-asetil glukozamin saf su içerisinde özld. Bu özeltiden 5 farklı tüpe farklı miktarlarda alınarak zerine 1 ML DNS solüsyonu eklendi ve 10 dakika kaynatıldı. Soğuması beklendikten sonra 540 nm’ de absorbans değerleri ölçüldü. Çalışma üç tekrarlı şekilde yapıldı.  tekrarda elde edilen sonuçların ortalamaları alınarak grafik oluşturuldu. Standart NAG özeltisi kullanılarak hazırlanan grafiğin eğim çizgisinden elde edilen denklemde absorbans değerleri yerine konularak enzim aktiviteleri belirlendi (Görmez,2014).

1 dakikada 1 μmol N-Asetil glukozamin açığa çıkması için gerek olan enzim miktarı, 1 unite (U) enzim aktivitesi olarak belirtilmiştir (Yılmaz,2019).

3.2.15.Bradford metodu kullanılarak protein miktarının belirlenmesi

Bradford reaktifinin hazırlanışı

Boş bir beherin içine 50 ML etil alkol (% 95' lik) ve 100 ML fosforik asit (% 85' lik) eklendi. Üzerine 0.1 g Commassie brilliant blue G-250 ilave edildi. Sonrasında 1000 ML' ye tamamlanincaya kadar distile su ilave edilip karıştırıldıktan sonra karanlık bir ortamda bir gece boyunca bekletildi. Bir gece karanlıkta bekletildikten sonra filtre kağıdında süzüldü.

Bradford metodu

Bu yöntemle negatif yüklü olan Commassie Brilliant G-250 boyasının proteinlerdeki pozitif yüke bağlanması özelliğinden faydalanılmıştır. Standart olarak BSA (Sığır serum albümin) kullanıldı. Öncelikle BSA' dan 1 mg/ML stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok saf su kullanılarak seyreltilti. Önceden hazırlanmış olan Bradford reaktifinden 1 ML eklendi ve 10 dk karanlık bir ortamda bekletildikten sonra spektrofotometrede 595 nm' de absorbans değeri ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak grafik oluşturuldu.

Kısmi saflaştırılmış enzim preparasyonlarının (50 µl) üzerine daha önceden hazırlanmış olan Bradford reaktifinden 1 ML eklendi. Karanlık bir ortamda 10 dk bekletildikten sonra spektrofotometrede 595 nm' de absorbans değeri ölçüldü. Blank (kör) olarak enzim yerine aynı miktarda distile su kullanıldı. Ölçüm sonuçları, oluşturulan grafiğin eğilim çizgisinden elde edilen formülde yerine konularak örneklerdeki protein miktarları hesaplandı (Yılmaz, 2019).

3.2.16. Kitinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi

- Fosfat- Sitrat Tamponu (0.2 M)

4.0, 4.5, 5.0, 5.5 aralıklarındaki pH değerlerinde kitinaz enziminin aktivitesini belirlemek için kullanıldı.

- Sodyum- Fosfat Tamponu (0.2 M)

6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 aralıklarındaki pH değerlerinde kitinaz enziminin aktivitesini belirlemek için kullanıldı.

- Glisin- NaOH Tamponu (0.2 M)

8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5 aralıklarındaki pH değerlerinde kitinaz enziminin aktivitesini belirlemek için kullanıldı.

- Boraks- NaOH Tamponu (0.2 M)

11.0, 11.5, 12.0, 12.5 aralıklarındaki pH değerlerinde kitinaz enziminin aktivitesini belirlemek için kullanıldı.

Kısmi saflaştırılmış enzim preparasyonlarından 0.5 ML ve substrat olarak kullanılan % 5' lik koloidal kitin+ kullanılacak tampon karışımından 0.5 ML bir durham tüpünde iyice karıştırıldıktan sonra 37 °C' de 30 dk inkübe edildi. Ardından içlerine 1 ML DNS (Dinitrosalisilik asit) solüsyonu eklendi, 5 dk manyetik karıştırıcıda kaynar suyun içerisine konuldu ve kaynatıldı. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra tüplerin soğuması beklendi. Sonrasında 6000 rpm ve +4 °C' de, 30 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar temiz tüplere alındı. Blank (Kör) ile spektrofotometre sıfırlandı ve sonrasında 550 nm dalga boyuna ayarlanan spektrofotometre ile değerler okundu ve okunan değerler kaydedildi. (Ferrari ve ark., 2014; Kuzu, 2008) Spektrofotometrede tüm absorbans değerleri ölçüldükten sonra, ölçülen en yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değerinde enzim aktivitesi % 100 kabul edildi. Diğer ölçülen değerlerin % aktivitesi en yüksek aktivite üzerinden hesaplandı (Aygan, 2008).

3.2.17. Kitinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi

30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C ve 100 °C sıcaklıklarında kitinaz enziminin aktivite ölçümü yapıldı. Üç bakteri suşu içinde aktivitelerinin en yüksek olduğu belirlenen pH değerlerindeki tamponlar kullanıldı. Kısmi saflaştırılmış enzim preparasyonlarından 0.5 ML ve substrat olarak kullanılan % 5' lik kolloidal kitin+ kullanılacak tampon karışımından 0.5 ML bir durham tüpünde iyice karıştırıldıktan sonra belirtilen sıcaklıklarda 30 dk inkübe edildi. Ardından içlerine 1 ML DNS (Dinitrosalisilik asit) solüsyonu eklenmiş, 5 dk manyetik karıştırıcıda kaynar suyun içerisine konuldu ve kaynatıldı. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra tüplerin soğuması beklendi. Sonrasında 6000 rpm ve +4 °C' de, 30 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantlar temiz tüplere alındı. Blank (Kör) ile spektrofotometre sıfırlandı ve sonrasında 550 nm dalga boyuna ayarlanan spektrofotometre ile değerler okundu ve okunan değerler kaydedildi (Ferrari ve ark., 2014; Kuzu, 2008). Spektrofotometrede tüm absorbans değerleri ölçüldükten sonra, ölçülen en yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık değerinde enzim aktivitesi % 100 kabul edildi. Diğer ölçülen değerlerin % aktivitesi en yüksek aktivite üzerinden hesaplandı (Aygan, 2008).

3.2.18.Kitinaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Kitinaz enziminin sıcaklık stabilitesinin saptanması amacıyla B-98, B-123, B-124 kodlu bakteri suşlarının ürettiği enzimler 30-100 °C aralığındaki sıcaklıklarda 3 saat boyunca ön inkübasyona tabii tutuldu. Ön inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra 0.5 ML enzim ve 0.5 ML substrat (her bakteri için optimum pH değerinde hazırlanmış) bakterilerin optimum aktivitelerinin görüldüğü sıcaklık değerlerinde 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra enzim+ substrat karışımına 1 ML DNS çözeltisi eklendi ve 5 dk manyetik karıştırıcıda kaynar suyun içinde bekletildi. Kaynatma için gerekli süre tamamlandıktan sonra tüplerin soğuması beklendi ve 6000 rpm +4 °C 'de 30 dk santrifüj işlemi yapıldı. Süpernatantlar temiz tüplere aktarıldıktan sonra spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu.

Enzimin orijinal aktivitesinin belirlenmesi için ön inkübasyona tabii tutulmamış olan enzim ve substrat (her bakteri için optimum pH değerinde hazırlanmış) optimum aktivitelerinin görüldüğü sıcaklık değerlerinde 30 dk inkübasyona bırakıldı ve aktivite tayini yapıldı (Aygan, 2008).

3.2.19.Kitinaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi

Tampon içerisinde bulunan enzimler, saklandıkları tampondan kurtarılmak için 6000 rpm’ de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöktürme işlemi tamamlandıktan sonra (pH 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0) yeni tampon çözeltiler hazırlandı. Tamponlardan enzimlerin üzerine 2 ml eklendikten sonra 3 saat 37 °C’ de ön inkübasyona bırakıldı. Ön inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra 0.5 ML enzim ve 0.5 ML substrat (her bakteri için optimum pH değerinde hazırlanmış) bakterilerin optimum aktivitelerinin görüldüğü sıcaklık değerlerinde 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra enzim+ substrat karışımına 1 ML DNS çözeltisi eklendi ve 5 dk manyetik karıştırıcıda kaynar suyun içinde bekletildi. Kaynatma için gerekli süre tamamlandıktan sonra tüplerin soğuması beklendi ve 6000 rpm +4 °C ‘de 30 dk santrifüj işlemi yapıldı. Süpernatantlar temiz tüplere aktarıldıktan sonra spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu (Kuzu, 2008; Aygan, 2008).

3.2.20. Çeşitli kimyasalların kitinaz enzimi aktivitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Kullanılan Kimyasallar

- 1-10 Phenanthroline
- BaCl₂
- CaCl₂
- CoCl₂
- CuCl₂
- EDTA
- FeCl₃
- HgCl₂
- KCl
- MgCl₂
- MnCl₂
- Na₂SO₃
- NaCl
- NiCl₂
- PMSF
- Üre (CH₄N₂O)

Belirtilen kimyasalların kitinaz enziminin aktivitesi üzerinde gösterdiği inhibe ve aktive etkiler belirlendi. Kimyasallar iki farklı konsantrasyonda (1 mM- 5 mM ve % 1- % 5) hazırlandı. Çalışma olan optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri ile sürdürüldü. Deney sonucunda hangi kimyasalların aktivatör etki gösterdiği, hangi kimyasalların inhibitör etki gösterdiği ve hangi kimyasalların hiçbir etkisi olmadığı tespit edildi ve sonuçlar kaydedildi (Kuzu, 2008).



Şekil 3.18. Enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların etkisi

Kimyasalların kitinaz enzimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla 0.5 ML enzim üzerine kimyasallar sırasıyla eklendi. 37 °C' de 30 dk ön inkübasyon yapıldı. Inkübasyon süresi tamamlandığında 0.5 ML enzim ve 0.5 ML substrat optimum sıcaklık değerinde 30 dk inkübe edildi. Inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra enzim+ substrat karışımı üzerine toplam hacim kadar DNS çözeltisi eklendi ve spektrofotometrede absorbans değerleri okundu. Blank (Kör) için kullanılan tüpe kimyasal eklemesi yapılmadı (Kuzu, 2008).

4.BULGULAR

4.1.Bulgular

4.1.1.Almus baraj gölünden örneklerin toplanması, saflaştırılması ve stoğa alınması

Toprak örnekleri Almus Baraj Gölünün 11 farklı lokasyonundan toplandı ve seyreltilerek NA besiyerine ekildi. İnkübasyon süresinin sonunda her bir koloni ayrı ayrı seçilip tekrardan ekildive saf hale getirildi. Saf hale getirilen bakteriler sıvı besiyerine alındı ve oradan matriks karışımına mikro pipet yardımıyla aktarılarak stoğa alındı.

4.1.2.CHDA agarda kitinaz üreten suşların belirlenmesi

Stoğa alınan bakteriler CHDA Besiyerine damlatma metodu ile ekildi ve kitinaz aktivitesi gösterip göstermediğini anlamak amacıyla clear zone oluşturup oluşturmadığı incelendi. İnkübasyon süresinin sonunda 60 tane bakterinin kitinaz aktivitesi gösterdiği tespit edildive bu bakteriler tekrardan stoğa alındı.

4.1.3.Kolloidal kitinin hazırlanması

Kitin ve HCl protokole uygun oranlarda karıştırıldıktan sonra ilk denemede 400 devir/dk' da çalkalamalı inkübatörde 24 saat bırakıldı. Aynı işlem 120 devir/dk olarak bir kez daha yapıldı. Sonrasında gerekli miktarda etil alkol eklendi 24 saat oda sıcaklığında bırakıldı. 24 saatin sonunda santrifüj yapıldı ve düşük rpm' de yapılan çalışmadan daha fazla ürün elde edildiği tespit edildi. Bu yüzden protokolde belirtilen 400 devir/dk 120 devir/dk olarak revize edildi.

4.1.4.CHDA besiyerinde kitinaz aktivitesinin saptanması

Üç farklı kolloidal kitin örneği kullanarak CHDA Agar hazırlandı.

Bunlara yapılan etiketlemeler;

CHDA AGAR —→ Standart Kitin

CHDA AGAR 1 —→ Phoma tracheiphila+ Aspergillus niger + Aspergillus flavus

CHDA AGAR 2 —→ Phoma tracheiphila+ Aspergillus flavus

CHDA AGAR 3 —→ Böcek ekzo isketleri (Crab Shells)

CHDA besiyerinde (Standart kolloidal kitin içeren): 60 bakteride üreme görüldü.

Bunlardan 12 tanesindeki clear zone oluşumu çok güçlü iken geriye kalan 48 tanesinde zayıf clear zone oluşumu görüldü.

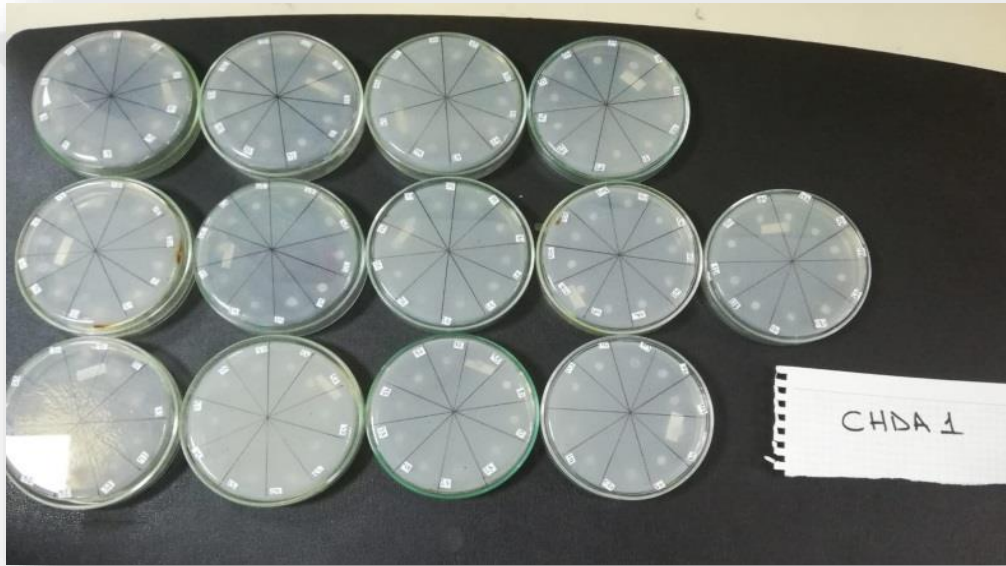
CHDA Agar için güçlü clear zone oluşumu gösteren bakteri kodları;

- B-8
- B-35
- B-48
- B-50
- B-57
- B-74
- B-86
- B-98
- B-107
- B-118
- B-123
- B-124

CHDA AGAR 1’ de; 20 bakteride üreme görüldü. Bunlardan 2 tanesindeki clear zone oluşumu güçlü iken geriye kalan 18 tanesindeki clear zone oluşumu kabul edilemeyecek kadar miktarda oldu.

CHDA AGAR 1 için güçlü clear zone oluşumu gösteren bakteri kodları;

- B-65
- B-118

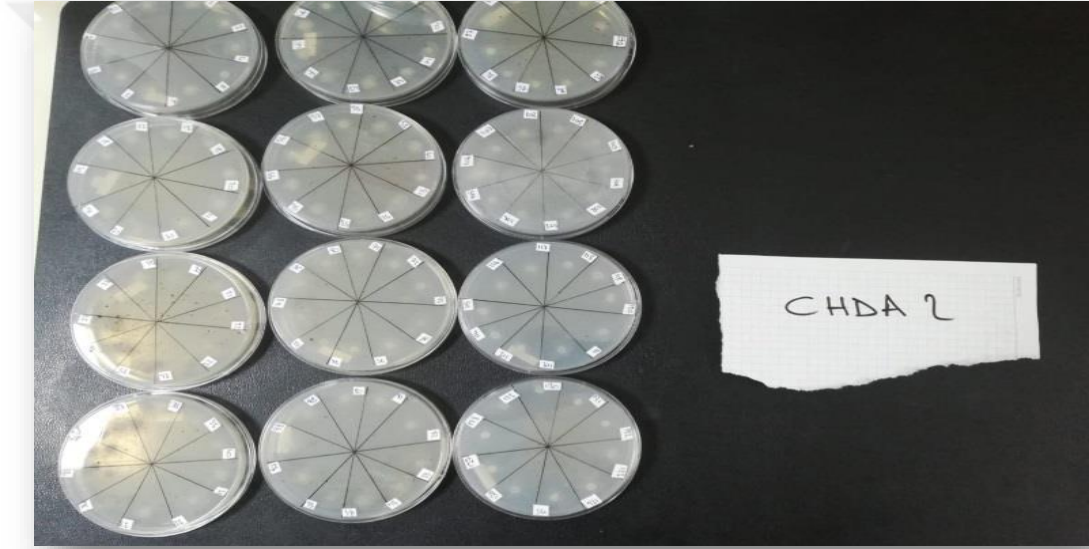


Şekil 4.1. CHDA 1 besiyerinde kitinaz aktivitesi

CHDA AGAR 2' de; 35 bakteride üreme görüldü. Bunlardan 3 tanesinde clear zone oluşumu güçlü iken, geriye kalan 32 tanesindeki clear zone oluşumu kabul edilmeyecek kadar az miktarda oldu.

CHDA AGAR 2 için güçlü clear zone oluşumu gösteren bakteri kodları;

- B-54
- B-57



Şekil 4.2. CHDA 2 besiyerinde kitinaz aktivitesi

CHDA AGAR 3' de; 65 bakteride üreme görüldü. Bunlardan 8 tanesinde clear zone oluşumu çok güçlü iken, geriye kalan 57 tanesinde clear zone oluşumu zayıf şekilde oldu.

CHDA AGAR 3 için güçlü clear zone oluşumu gösteren bakteri kodları;

- B-8
- B-46
- B-50
- B-57
- B-74
- B-98
- B-123
- B-124



Şekil 4.3. CHDA 3 besiyerinde kitinaz aktivitesi

Elde edilen sonuçlara göre 4 farklı kolloidal kitin içerisinde bakterilerin üreme miktarı en fazla olandan en az olana doğru sırayla;

1. CHDA AGAR 3 (Crab Shell)
2. CHDA AGAR (Standart kitin)
3. CHDA AGAR 2 (Phoma tracheiphila+ Aspergillus flavus)
4. CHDA AGAR 1 (Phoma tracheiphila+ Aspergillus flavus+ Aspergillus niger)

olarak belirlendi. CHDA AGAR 1’ de 130 izolat içerisinde 20 izolat gelişme gösterdi. Bu 20 izolat içerisinde güçlü clear zone oluşumu 2 suşta meydana geldiği görüldü. CHDA AGAR 2’ de 130 izolat içerisinde 35 izolat gelişme gösterdi. Bu 35 izolat içerisinde clear zone oluşumunun 3 suşta meydana geldiği görüldü. CHDA AGAR 3’ te 130 izolat içerisinde 65 izolat gelişme göstermesine rağmen güçlü clear zone oluşumu 8 suşta tespit edildi. CHDA AGAR 1, 2 ve 3 protokollerinde yeterli clear zone oluşumu görülmediği için CHDA AGAR protokolünde en fazla ve en etkili sayıda clear zone oluşumu meydana geldiği için tercih edildi ve çalışmalara standart kitin protokolü (CHDA AGAR) üzerinden devam edildi.

4.1.5.Kitinaz enziminin kısmi olarak saflaştırılması

Standart koloidal kitin içeren besiyerinde çok güçlü clear zone oluşumu gösteren 12 bakteri içerisinden en etkili olan 6 tanesi seçildi ve bu bakteriler önce stoklardan alınıp dört fazlı ekim metodu ile ekildi sonrasında protokole uygun olarak önce kitinli LB besiyerine, sonra % 1 koloidal kitin içeren M9 Besiyerine transfer edildi. Santrifüj edildikten sonra hacimlerinin % 70' i kadar etil alkol eklendi ve 24 saat -18 °C' de bekletildikten sonra tekrar santrifüj edildi (Folders ve ark., 2000; Kuzu ve ark., 2012).

Bakteri Kodu	Hacim Miktarı	Eklenecek Etil Alkol
B-8	465 ML	325.5 ML
B-57	480 ML	336 ML
B-98	470 ML	329 ML
B-118	475 ML	322.5 ML
B-123	430 ML	301 ML
B-124	440 ML	308 ML

Çizelge 4.1. Kısmi Enzim Saflaştırması İçin Gereken Alkol Miktarı

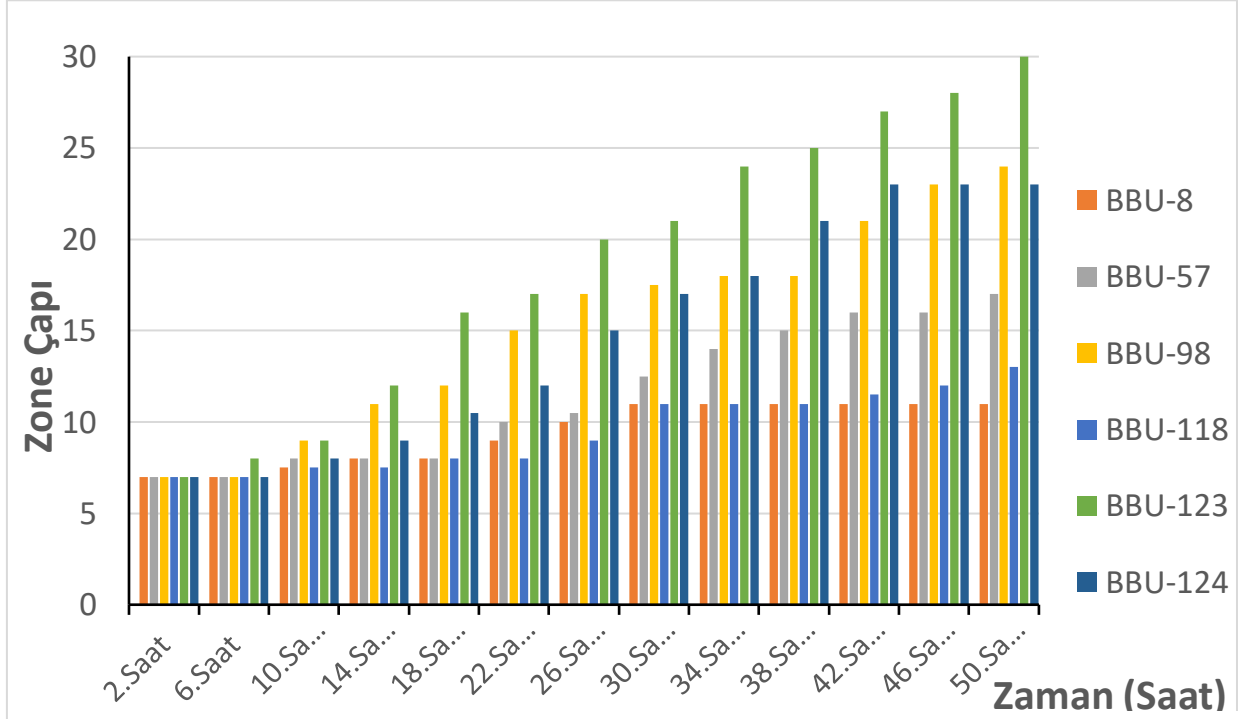
- Süpernatant hacminin % 70' i kadar etil alkol eklendi.
- Süpernatant hacmi $\times 0.7 =$ Etil Alkol Miktarı

4.1.6.CHDA agarda kitinaz aktivitesinin belirlenmesi

CHDA Agar üzerine durham tüpü ile kuyucuklar açılmış ve bu açılan kuyucuklara kısmi saflaştırılmış olan enzim preparasyonundan 1 ML damlatılmıştır. 37 °C’ de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2. Saatten itibaren her 4 saatte bir hidroliz zonelerinin çapları ölçülmüştür. Sonuçlar tablo ve grafik haline getirilmiştir (Kuzu, 2008).

Örnekler/ Saatler	2.S aat	6.S aat	10. Saa t	14. Saa t	18. Saa t	22. Saa t	26. Saa t	30. Saa t	34. Saa t	38. Saa t	42. Saa t	46. Saa t	50. Saa t
BBU-8	7	7	7,5	8	8	9	10	11	11	11	11	11	11
BBU-57	7	7	8	8	8	10	10.5	12.5	14	15	16	16	17
BBU-98	7	7	9	11	12	15	17	17.5	18	18	21	23	24
BBU-118	7	7	7.5	7.5	8	8	9	11	11	11	11.5	12	13
BBU-123	7	8	9	12	16	17	20	21	24	25	27	28	30
BBU-124	7	7	8	9	10.5	12	15	17	18	21	23	23	23

Çizelge 4.2. CHDA agarda clear zone oluşumları



Grafik 4.1. CHDA agarda clear zone oluşumları

4.1.7.Kitinaz aktivitesinin DNS ile saptanması

Kısmi saflaştırılmış enzim preparasyonları ve substrat miktarlarında yanlışlık olmaması adına farklı konsantrasyonlarda denemeler yapıldı. Doğru konsantrasyon belirlendikten sonra enzim ve substrat 50 °C ve 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından DNS eklendi

ve kaynatıldı. 5 dk kaynatıldıktan sonra santrifüj edilmiş ve süpernatant temiz tüplere alınmıştır. Spektrofotometre blank ile sıfırlandı ve ardından 560 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur (Ferrari ve ark., 2014 ve Kuzu,2008).

Örnek	Absorbans Değeri
Blank	0.187 A
B-8	0.291 A
B-57	0.243 A
B-98	0.325 A
B-118	0.316 A
B-123	0.370 A
B-124	0.445 A

Çizelge 4.3. DNS ile kitinaz aktivitesi ölçüm sonuçları

- Her bir bakteri için absorbans ölçümleri üç seri şeklinde yapılmış ve bu değerlerin ortalamaları alınarak sonuçlar çizelgehaline getirilmiştir.

CHDA Agarda yapılan kitinaz akitivesi ölçümü ve dns ile yapılan kitinaz aktivitesi ölçümleri sonucunda elde edilen verilerden yola çıkarak en yüksek aktivite gösteren üç bakteri suşu seçilmiş ve kalan deneylere bu üç bakteri suşu ile devam edilmiştir.

4.1.8.TLC kromotografisi

Kısmi olarak saflaştırılmış olan kitinaz enzimleri substrat çözeltileri ile 50 °C’ de reaksiyona sokulmuştur. Kitinaz ürünlerinin doğrulanabilmesi için % 4’ lük glikoz

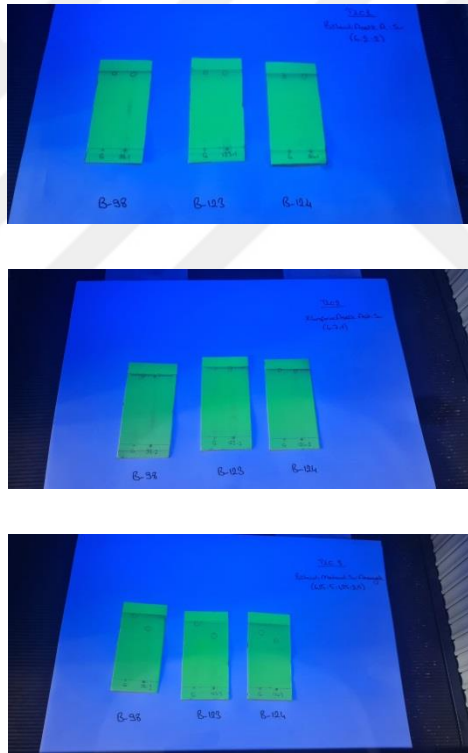
örneğinden 5' er μL marker olarak plak üzerine 1 μL ' lik şırınga ile yüklenmiştir. Ürünlerdende 10 μL yüklendikten sonra yürütme işlemi için plaklar tanklardaki çözücülerin içerisine yerleştirilmiştir. Hareketli faz olarak üç farklı çözücü kullanılmıştır. Bunlar;

TLC 1; Bütanol: Asetik asit: Distile su (6:2:2)

TLC 2; Kloroform: Asetik asit: Distile su (6:7:1)

TLC 3; Bütanol: Metanol: Amonyak: Distile su: (5:4:2:1)

(Kim ve ark., 1995; Singh ve ark., 2004; Ghebregzabher ve ark., 1976)



Şekil 4.4. Tlc kromotografi sonuçlarının uv ışık altında görüntülenmesi

$$R_f = \frac{\text{Bileşiğin uygulama noktasından itibaren aldığı yol}}{\text{Çözücünün aldığı yol}} = \frac{d_{\text{madde}}}{d_{\text{çözelt}}}$$

eşitliği üzerinden hesaplamalar yapılmış ve sonuçlar çizelge 4.1.8. ' de belirtilmiştir.

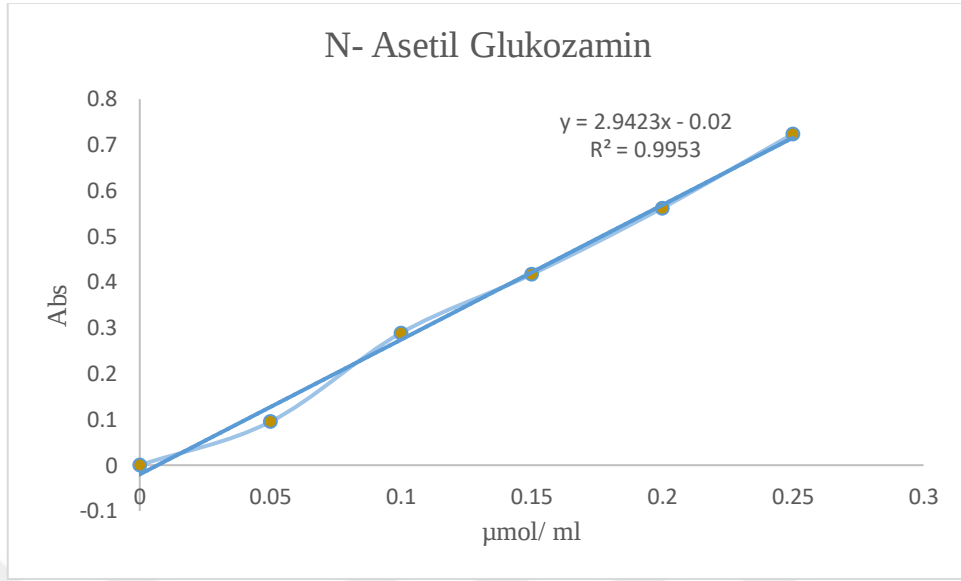
<u>TLC 1</u>		<u>TLC 2</u>		<u>TLC 3</u>	
<u>G</u>	<u>98</u>	<u>G</u>	<u>98</u>	<u>G</u>	<u>98</u>
5.8/5.9	5.6/5.9	5.7/6	5.8/6	5.7/6	4.6/6
= 0.98	= 0.95	= 0.95	= 0.97	= 0.95	= 0.77
<u>G</u>	<u>123</u>	<u>G</u>	<u>123</u>	<u>G</u>	<u>123</u>
5.9/6.1	5.7/6.1	6/6.1	5.9/6.1	5.8/6	4.7/6
= 0.97	= 0.93	= 0.98	= 0.97	= 0.97	= 0.78
<u>G</u>	<u>124</u>	<u>G</u>	<u>124</u>	<u>G</u>	<u>124</u>
5.9/6	5.8/6	6/6.1	5.8/6.1	5.1/6	4.4/6
= 0.98	= 0.97	= 0.98	= 0.95	= 0.85	= 0.73

Çizelge 4.4. Rf değerlerinin ölçüm sonuçları

*G: Kontrol olarak kullanılan % 4' lük glikoz çözeltisi

Kısmi olarak saflaştırılmış olan enzimlerin hidrolizi sonucu oluşan bantlardan elde edilen sonuçlara göre kitinaz enziminin kitini son ürün olarak glikoza dönüştürdüğü tespit edilmiştir.

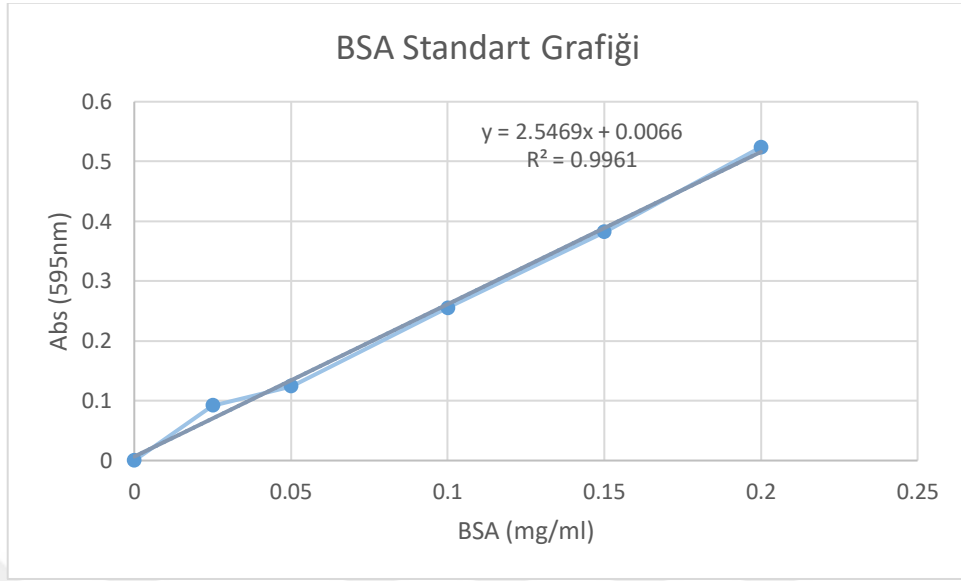
4.1.9.Enzim aktivitesinin belirlenmesi için NAG grafiği oluşturulması



Grafik 4.2. N-Asetil glukozamin standart grafiği

N-asetil glukozamin standart eğrisi kullanılarak ileride yapılacak olan deneylerdeki absorbans değerleri eğri denkleminde yerine yazılacak ve aktivite değeri hesaplanacaktır. Sonrasında elde edilen absorbans değerlerinden en yüksek olan değer % 100 kabul edilecek ve geriye kalan değerler bu değer üzerinden yüzde şeklinde hesaplanacaktır.

4.1.10. Bradford metodu kullanılarak protein miktarının belirlenmesi



Çizelge 4.3. BSA standart grafiği

BSA kullanılarak belirlenen grafiğin eğiminden elde edilen denklem ile örneklerdeki protein konsantrasyonu belirlenmiştir.

Grafikteki eğimden elde edilen denklemde ($y=ax+b$) y değeri yerine elde edilen absorbans değerleri konulduğu zaman x değeri enzim içerisindeki bilinmeyen protein konsantrasyonunu verecektir.

Buna göre;

B-98 kodlu bakteri için toplam protein miktarı: 0.2905 mg/ML

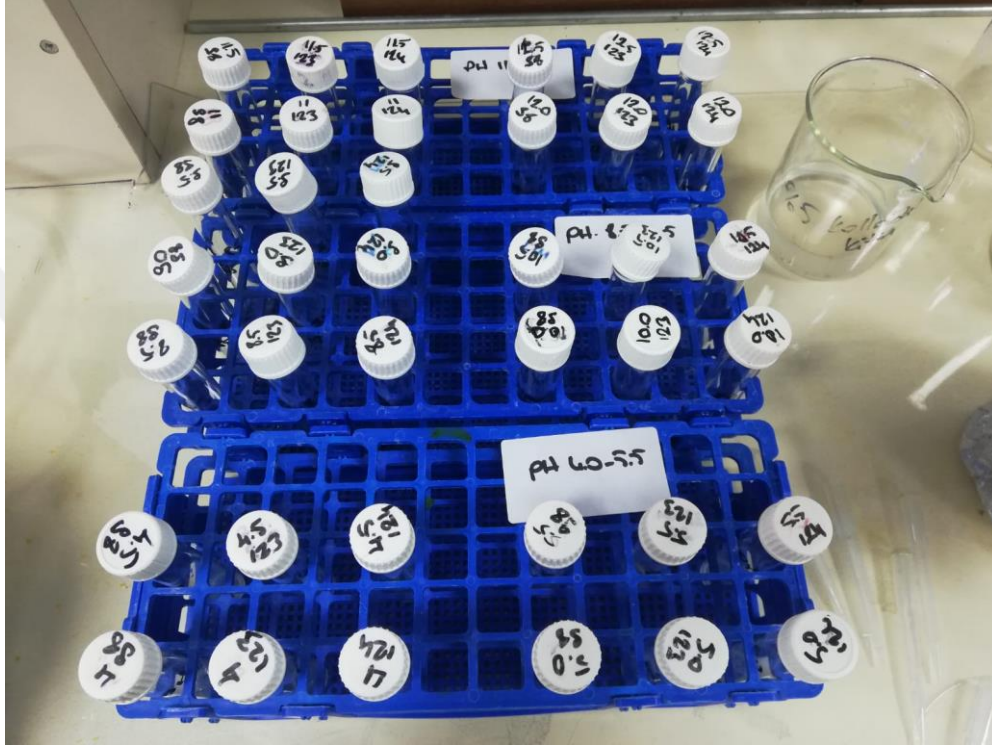
B-123 kodlu bakteri için toplam protein miktarı: 0.2412 mg/ML

B-124 kodlu bakteri için toplam protein miktarı: 0.3025 mg/ML

olarak bulunmuştur.

4.1.11.Kitinaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi

4 farklı tampon ile toplamda 18 farklı pH değerinde çalışılmıştır. Yapılmış olan çalışmalar 3 paralel şekilde gerçekleştirilmiştir. Çıkan sonuçların ortalaması alınarak sonuçlar tablo haline getirilmiştir.



Şekil 4.5. Kitinaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi

Spektrofotometrede tüm absorbans değerleri ölçüldükten sonra, ölçülen en yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değerinde enzim aktivitesi % 100 kabul edilmiştir. Diğer ölçülen değerlerin enzim aktivitesi (%), en yüksek aktivite üzerinden hesaplanmıştır (Aygan, 2008).

Fosfat- Sitrata Tamponu

Fosfat- Sitrata Tamponu			
pH 4.0 için	B-98 0.016 A	B-123 0.032 A	B-124 0.101 A
Aktivite Değerleri (%)	%12.11	%15.92	%20.26
pH 4.5 için	B-98 0.045 A	B-123 0.079 A	B-124 0.118 A
Aktivite Değerleri (%)	%21.87	%30.31	%23.10
pH 5.0 için	B-98 0.049 A	B-123 0.087 A	B-124 0.141 A
Aktivite Değerleri (%)	%23.22	%32.76	%26.96
pH 5.5 için	B-98 0.053 A	B-123 0.104 A	B-124 0.196 A
Aktivite Değerleri (%)	%24.56	%37.97	%36.16

Çizelge 4.5. Fosfat- sitrat tamponunda pH ölçüm ve aktivite (%) sonuçları

Sodyum- Fosfat Tamponu

Sodyum- Fosfat Tamponu			
pH 6.0 için	B-98	B-123	B-124
	0.098 A	0.132 A	0.223 A
Aktivite Değerleri (%)	%39.71	%46.54	%40.68
pH 6.5 için	B-98	B-123	B-124
	0.112 A	0.175 A	0.247 A
Aktivite Değerleri (%)	%44.42	%59.71	%44.70
pH 7.0 için	B-98	B-123	B-124
	0.156 A	0.201 A	0.263 A
Aktivite Değerleri (%)	%59.22	%67.67	%47.38
pH 7.5 için	B-98	B-123	B-124
	0.177 A	0.215 A	0.276 A
Aktivite Değerleri (%)	%66.29	%71.95	%49.56
pH 8.0 için	B-98	B-123	B-124
	0.210 A	0.230 A	0.398 A
Aktivite Değerleri (%)	%77.40	%76.55	%69.98

Çizelge 4.6. Sodyum- fosfat tamponunda pH ölçüm ve aktivite (%) sonuçları

Glisin- NaOH Tamponu

Glisin- NaOH Tamponu			
pH 8.5 için	B-98	B-123	B-124
	0.252 A	0.235 A	0.577 A
Aktivite Değerleri (%)	%91.53	%78.08	%100
pH 9.0 için	B-98	B-123	B-124
	0.277 A	0.272 A	0.502 A
Aktivite Değerleri (%)	%100	%89.41	%87.40
pH 9.5 için	B-98	B-123	B-124
	0.239 A	0.295 A	0.487 A
Aktivite Değerleri (%)	%87.15	%96.45	%84.88
pH 10.0 için	B-98	B-123	B-124
	0.217 A	0.298 A	0.450 A
Aktivite Değerleri (%)	%79.75	%97.37	%78.69
pH 10.5 için	B-98	B-123	B-124
	0.205 A	0.307 A	0.372 A
Aktivite Değerleri (%)	%75.71	%100	%65.63

Çizelge 4.7. Glisin- NaOH tamponunda pH ölçüm ve aktivite (%) sonuçları

Borax- NaOH Tamponu

Borax- NaOH Tamponu			
	B-98	B-123	B-124
pH 11.0 için	0.123 A	0.214 A	0.220 A
Aktivite Değerleri (%)	%48.12	%71.65	%40.18
	B-98	B-123	B-124
pH 11.5 için	0.098 A	0.161 A	0.102 A
Aktivite Değerleri (%)	%39.71	%55.42	%20.43
	B-98	B-123	B-124
pH 12.0 için	0.093 A	0.109 A	0.065 A
Aktivite Değerleri (%)	%38.02	%39.50	%14.23
	B-98	B-123	B-124
pH 12.5 için	0.045 A	0.098 A	0.063A
Aktivite Değerleri (%)	%21.87	%36.13	%13.90

Çizelge 4.8. Borax- NaOH tamponunda pH ölçüm ve aktivite (%) sonuçları

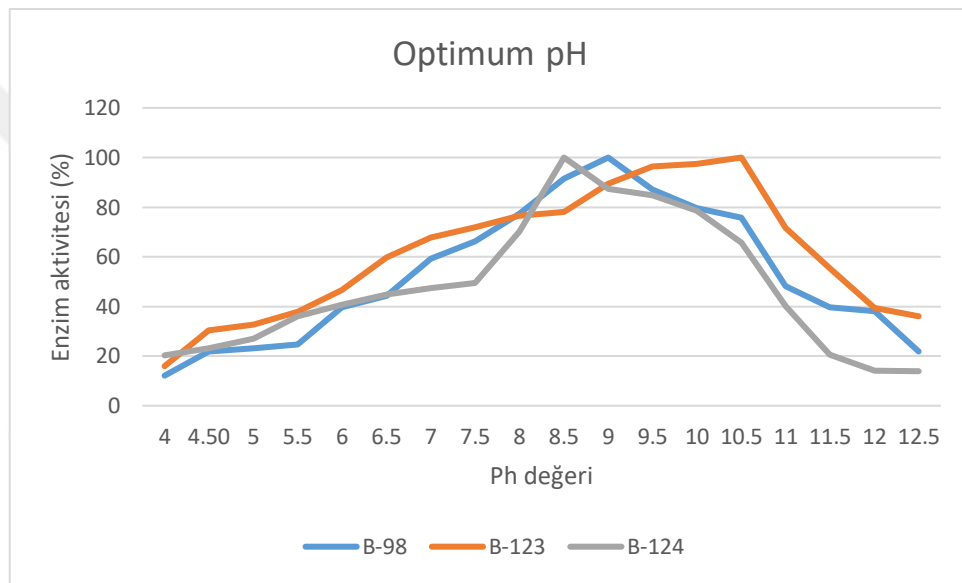
pH değerlerinin ölçümleri sonucunda;

B-98 kodlu bakterinin optimum aktivite gösterdiği pH 9.0

B-123 kodlu bakterinin optimum aktivite gösterdiği pH 10.5

B-124 kodlu bakteri nin optimum aktivite gösterdiği pH 8.5 olarak belirlendi.

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen bilgiler ışığında Almus baraj gölü tabanından izole edilmiş olan bakterilerin ürettiği kitinaz enziminin bazik özellik gösterdiği tespit edildi.



Grafik 4.4. Optimum pH değerleri

4.1.12.Kitinaz enziminin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

8 farklı sıcaklık değeri ile (30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C) çalışıldı. Yapılmış olan çalışmalar 3 paralel şekilde gerçekleştirilmiştir. Çıkan sonuçların ortalaması alınarak sonuçlar tablo haline getirildi.

pH değerlerinin ölçümleri sonucunda;

B-98 kodlu bakterinin optimum aktivite gösterdiği pH 9.0

B-123 kodlu bakterinin optimum aktivite gösterdiği pH 10.5

B-124 kodlu bakterinin optimum aktivite gösterdiği pH 8.5 olarak belirlendi ve optimum sıcaklık değeri belirlenirken bu pH aralığındaki Glisin- NaOH tamponları kullanıldı.

Deney protokole uygun olarak yapıldıktan sonra spektrofotometrede tüm absorbans değerleri ölçüldü ve ölçülen en yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık değerinde enzim aktivitesi % 100 kabul edildi. Diğer ölçülen değerlerin % aktivitesi en yüksek aktivite üzerinden hesaplandı (Aygan, 2008).

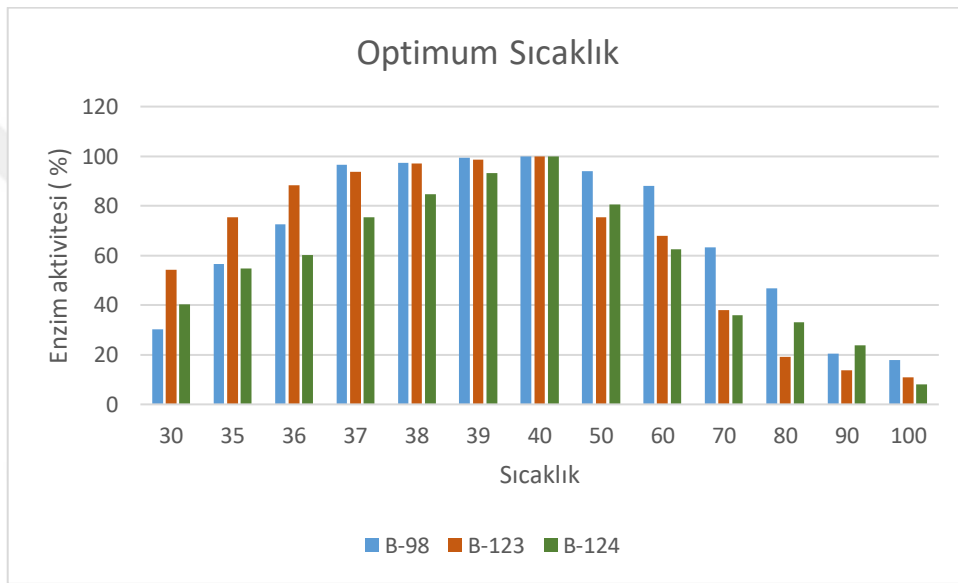
Sıcaklık	B-98	B-123	B-124
30 °C	0.071 A	0.165 A	0.301 A
Aktivite Değerleri (%)	%30.32	%54.20	%40.41
35 °C	0.150 A	0.237 A	0.416 A
Aktivite Değerleri (%)	%56.65	%75.30	%54.88
36 °C	0.198 A	0.281 A	0.458 A
Aktivite Değerleri (%)	%72.64	%88.19	%60.17
37 °C	0.270 A	0.300 A	0.579 A
Aktivite Değerleri (%)	%96.63	%93.76	%75.40
38 °C	0.272 A	0.311 A	0.653 A
Aktivite Değerleri (%)	%97.30	%96.98	%84.72
39 °C	0.278 A	0.317 A	0.720 A
Aktivite Değerleri (%)	%99.30	%98.74	%93.15
40 °C	0.280A	0.320 A	0.775 A
Aktivite Değerleri (%)	%100	%100	%100

Çizelge 4.9. 30-40 °C arası sıcaklıklarda absorbans ve aktivite (%) değerleri

Sıcaklık	B-98	B-123	B-124
50 °C	0.262 A	0.237 A	0.620 A
Aktivite Değerleri (%)	%93.96	%75.30	%80.56
60 °C	0.244 A	0.212 A	0.476 A
Aktivite Değerleri (%)	%87.97	%67.97	%62.44
70 °C	0.170 A	0.110 A	0.265 A
Aktivite Değerleri (%)	%63.31	%38.09	%35.88
80 °C	0.120 A	0.045 A	0.243 A
Aktivite Değerleri (%)	%46,65	%19.04	%33.11
90 °C	0.041 A	0.027 A	0.170 A
Aktivite Değerleri (%)	%20.33	%13.77	%23.92
100 °C	0.034 A	0.017 A	0.044 A
Aktivite Değerleri (%)	%17.99	%10.84	%8.06

Çizelge 4.10. 50- 100 °C arası sıcaklıklarda absorbans ve aktivite (%) değerleri

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen bilgiler ışığında Almus baraj gölü tabanından izole edilmiş olan bakterilerden elde edilmiş olan enzimler farklı sıcaklık değerlerinde inkübe edildi. Bu inkübasyonları takiben enzimlerin absorbans ölçümleri yapıldı. Spektrofotometre ile 550 nm dalga boyunda yapılmış olan absorbans ölçümleri sonucunda B- 98, B- 123 ve B- 124 numaralı bakterilerin optimum sıcaklıklarının 40 °C olduğu ve dolayısıyla mezofilik karakterde oldukları tespit edildi.

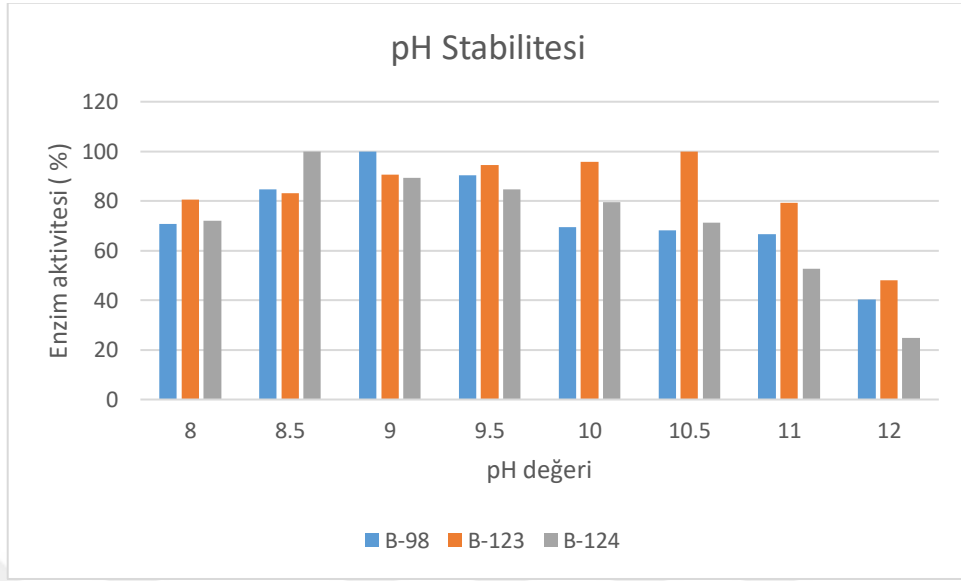


Grafik 4.5. Optimum sıcaklık değerleri

4.1.13. Kitinaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi

B- 98		B- 123		B- 124	
pH	%	pH	%	pH	%
8.0	70.63	8.0	80.46	8.0	72.01
8.5	84.70	8.5	83.08	8.5	100
9.0	100	9.0	90.63	9.0	89.43
9.5	90.28	9.5	94.41	9.5	84.68
10.0	69.57	10.0	95.86	10.0	79.50
10.5	68.24	10.5	100	10.5	71.29
11.0	66.65	11.0	79.30	11.0	52.71
12.0	40.36	12.0	47.93	12.0	24.91

Çizelge 4.11. Kitinaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi

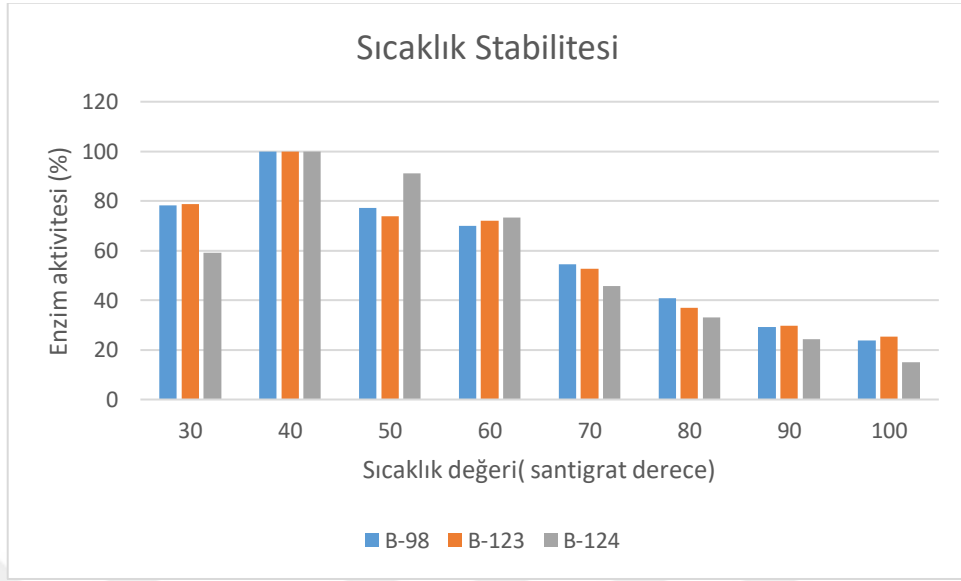


Grafik 4.6. pH stabilitesi değeri

4.1.14.Kitinaz enziminin sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

B- 98		B- 123		B- 124	
Sıcaklık	%	Sıcaklık	%	Sıcaklık	%
30°C	78.22	30°C	78.74	30°C	59.21
40 °C	100	40 °C	100	40 °C	100
50 °C	77.22	50 °C	73.92	50 °C	91.03
60 °C	69.97	60 °C	71.94	60 °C	73.38
70 °C	54.48	70 °C	52.68	70 °C	45.64
80 °C	40.73	80 °C	36.82	80 °C	33.03
90 °C	29.24	90 °C	29.74	90 °C	24.38
100 °C	23.74	100 °C	25.21	100 °C	14.89

Çizelge 4.12. Kitinaz Enziminin Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi



Grafik 4.7. Sıcaklık stabilitesi değerleri

4.1.15.Çeşitli kimyasalların kitinaz enzimi aktivitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

B-98 Kodlu Bakteri		
Kimyasal	Konsantrasyon/ Aktivite (%)	Konsantrasyon / Aktivite (%)
Na ₂ SO ₃	1 mM / + % 1.3	5 mM/ - % 4.7
1-10-Phenanthroline	1 mM / + % 5.8	5 mM/ + % 3.49
CH ₄ N ₂ O	1 mM / + % 3.66	5 mM/ - % 17.87
PMSF	1 mM / + % 3.26	5 mM/ - % 18.54
CuCl ₂ .2H ₂ O	1 mM / + % 27.13	5 mM/ + % 55.81
MgCl ₂ .6H ₂ O	1 mM / + % 2.9	5 mM/ - % 2.48
BaCl ₂ .2H ₂ O	1 mM / + % 24.31	5 mM/ - % 13.62
FeCl ₃	1 mM / - % 1.39	5 mM/ + % 13.22
MnCl ₂ .4H ₂ O	1 mM / + % 16.87	5 mM/ - % 12.85
KCl	1 mM / + % 2.1	5 mM/ + % 26.91
HgCl ₂	1 mM / - % 5.35	5 mM/ - % 17.66
CaCl ₂	1 mM / - % 6.67	5 mM/ + % 8.84
NiCl ₂	1 mM / + % 32.08	5 mM/ + % 22.14
CoCl ₂	1 mM / + % 16.15	5 mM/ + % 18.47

Çizelge 4.13. Çeşitli Kimyasalların B-98 Kodlu Bakterinin Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

B-123 Kodlu Bakteri		
Kimyasal	Konsantrasyon/ Aktivite (%)	Konsantrasyon / Aktivite (%)
Na ₂ SO ₃	1 mM / + % 5.23	5 mM/ - % 8.98
1-10-Phenanthroline	1 mM / - % 11.77	5 mM/ - % 6.14
CH ₄ N ₂ O	1 mM / + % 4.53	5 mM/ - % 13.61
PMSF	1 mM / + % 6.19	5 mM/ - % 15.74
CuCl ₂ .2H ₂ O	1 mM / + %37.06	5 mM/ + % 52.83
MgCl ₂ .6H ₂ O	1 mM / + % 13.29	5 mM/ - % 3.76
BaCl ₂ .2H ₂ O	1 mM / + % 2.40	5 mM/ - % 3.74
FeCl ₃	1 mM / - % 9.32	5 mM/ + % 2.13
MnCl ₂ .4H ₂ O	1 mM / + % 24.16	5 mM/ - % 6.28
KCl	1 mM / + % 16.42	5 mM/ + % 44.71
HgCl ₂	1 mM / + % 3.42	5 mM/ - % 8.73
CaCl ₂	1 mM / + % 17.30	5 mM/ + % 3.68
NiCl ₂	1 mM / + % 44.85	5 mM/ + % 36.67
CoCl ₂	1 mM / - % 15.29	5 mM/ - % 10.12
EDTA	1 mM / - % 4.63	5 mM/ - % 8.85

Çizelge 4.14. Çeşitli Kimyasalların B-123 Kodlu Bakterinin Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

B-124 Kodlu Bakteri		
Kimyasal	Konsantrasyon/ Aktivite (%)	Konsantrasyon / Aktivite (%)
Na ₂ SO ₃	1 mM / - % 1.64	5 mM/ - % 3.26
1-10-Phenanthroline	1 mM / + % 10.11	5 mM/ + % 22.78
CH ₄ N ₂ O	1 mM / + % 19.43	5 mM/ - % 26.85
PMSF	1 mM / + % 7.89	5 mM/ - % 11.57
CuCl ₂ .2H ₂ O	1 mM / + % 49.36	5 mM/ + % 58.23
MgCl ₂ .6H ₂ O	1 mM / + % 26.13	5 mM/ - % 7.71
BaCl ₂ .2H ₂ O	1 mM / + % 15.22	5 mM/ - % 16.08
FeCl ₃	1 mM / + % 8.36	5 mM/ - % 2.34
MnCl ₂ .4H ₂ O	1 mM / + % 31.27	5 mM/ - % 1.56
KCl	1 mM / + % 39.45	5 mM/ + % 53.58
HgCl ₂	1 mM / - % 12.94	5 mM/ - % 27.83
CaCl ₂	1 mM / - % 6.32	5 mM/ + % 9.27
EDTA	1 mM / - % 1.97	5 mM/ - % 5.38
CoCl ₂	1 mM / + % 37.04	5 mM/ + % 41.71
NiCl ₂	1 mM / + % 31.22	5 mM/ + % 10.14

Çizelge 4.15. Çeşitli Kimyasalların B-124 Kodlu Bakterinin Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlendiği bu çalışmada bakteriler üzerinde aktivite artışına sebep olan, aktivite azalmasına sebep olan ve bakterilerin enzim aktivitesi üzerinde etkisi yok sayılacak kadar az olan kimyasallar tespit edildi. Bu çalışmaya göre;

B-98 Bakterisinin enzim aktivitesi için:

- Aktivite artışına neden olan kimyasallar

CuCl₂ (% 55.81), NiCl₂ (% 32.08), KCl (% 26.91), CoCl₂ (% 18.47), FeCl₃ (% 13.22), 1-10-Phenanthroline (% 5.8)

- Aktivite azalmasına neden olan kimyasallar

PMSF (% 18.54), CH₄NO₂ (% 17.87), HgCl₂ (% 17.66)

- Etkisi ihmal edilebilecek kimyasallar (% 5' ten daha az etki edenler)

Na₂SO₃ ve MgCl₂

- BaCl₂ ve MnCl₂ 1mM' da enzim aktivitesini arttırırken 5 mM' da enzim aktivitesini azaltmıştır.
- CaCl₂ 1mM' da enzim aktivitesini azaltırken 5 mM' da enzim aktivitesini arttırmıştır.

B-123 Bakterisinin enzim aktivitesi için:

- Aktivite artışına neden olan kimyasallar

CuCl₂ (% 52.83), NiCl₂ (% 44.85), KCl (% 44.71), CaCl₂ (% 17.30), MgCl₂ (% 13.29)

- Aktivite azalmasına neden olan kimyasallar

CH₄NO₂ (% 13.61), CoCl₂ (% 15.29), 1-10-Phenanthroline (% 11.77), FeCl₃(% 9.32), EDTA (% 8.85), HgCl₂ (% 8.73)

- Etkisi ihmal edilebilecek kimyasallar (% 5' ten daha az etki edenler)

BaCl₂

- Na₂SO₃, PMSF ve MnCl₂ 1mM' da enzim aktivitesini arttırırken 5 mM' da enzim aktivitesini azaltmıştır.

B-124 Bakterisinin enzim aktivitesi için:

- Aktivite artışına neden olan kimyasallar

CuCl₂ (% 58.23), KCl (% 53.58), CoCl₂ (% 41.71), MnCl₂ (% 31.27), NiCl₂ (% 31.22), 1-10-Phenanthroline (% 22.78), FeCl₃ (% 8.36)

- Aktivite azalmasına neden olan kimyasallar

HgCl₂ (% 27.83), EDTA (% 5.38)

- Etkisi ihmal edilebilecek kimyasallar (% 5' ten daha az etki edenler)

Na₂SO₃

- CH₄NO₂, PMSF, MgCl₂ ve BaCl₂ 1mM' da enzim aktivitesini arttırırken 5 mM' da enzim aktivitesini azaltmıştır.
- CaCl₂ 1mM' da enzim aktivitesini azaltırken 5 mM' da enzim aktivitesini arttırmıştır.

4.2.Tartışma

Kuzu (2008) Kitinaz enziminin optimum sıcaklık ve pH değerini belirlemek için yaptığı deneyler sonucunda kitinaz enzimi üreticisi olarak kullandığı *Bacillus thuringiensis* bakterisinin, 110 °C ve pH 9.0' da optimum aktivite gösterdiğini tespit etmiştir.

Yılmaz (2019) Kitinaz enzimi ile ilgili yapmış olduğu tez çalışmasında kitinaz enzimi üreticisi olarak kullandığı *Aeromonas* sp. BHC02 bakterisinin optimum aktivitesinin, 30 °C ve pH 7.0' de olduğunu gözlemlemiştir. Aynı çalışma içerisinde protein miktarını belirlemek için yapmış olduğu deneyler sonucunda protein miktarını 0.2509 mg/ML olarak belirlemiştir.

Zhang ve ark. (2014) Kitinaz üreticisi olarak *Aeromonas veroni* bakterisini seçmişlerdir ve bakterinin optimum aktivite değerlerini pH 5.0 ve 50 °C olarak bulmuşlardır. Zarei ve ark. (2011) *Enterobacter* sp. kitinazı ile çalışmalarını yürütmüşlerdir. Optimum sıcaklık değerini 45 °C ve optimum pH değerini 5.0 olarak bulduklarını belirtmişlerdir. Lee ve ark. (2006) *Bacillus* sp. bakterisi kitinazı ile çalışmıştır ve optimum sıcaklık aktivite değerini 60 °C olarak belirlemiştir.

Wiwat ve ark. (1999) *Bacillus circulans* bakterisinin kitinaz aktivitesi gösteren No.4.1 suşu ile deneylerini sürdürmüşlerdir. Yapmış oldukları deneyler sonucunda bakterinin optimum sıcaklık değerinin 40 °C olduğunu ve çalıştıkları *Bacillus circulans* No.4.1 suşunun Tsujibo ve arkadaşlarının (1992) çalışmış olduğu *Alteromonas* sp. 0-7 suşu ile benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Kopparapu ve ark. (2012) *Paecilomyces thermophila*' dan klonladığı *PtChiA* genini *Escherichia coli*' ye ekprese ederek çalışmalarını sürdürmüştür. Yaptıkları deneyler sonucunda pH 4.0-10.5 aralığında geniş bir spektruma sahip optimum pH değeri bulmuşlardır. Loni ve ark. (2014) *Paenibacillus pasadenensis* NCIM 5434 suşu ile yaptıkları deneyler sonucunda kitinaz enziminin optimum değerlerini pH 10.0 ve 37 °C olarak bulmuşlardır. LeCleir ve arkadaşları *Paenibacillus rifitoensis* M2-26 suşunun pH 10' da optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Pleban ve arkadaşları *B.licheniformis* JS suşunun kitinaz enzim aktivitesi ölçüm deneyleri sonucunda optimum pH değerinin 5 ve 11 arasında geniş bir spektruma sahip olduğunu tespit etti. Aynı zamanda çalışmış olduğu başka bir çalışmada da *Bacillus cereus*'un optimum sıcaklığının 40°C olduğunu tespit etti.

Literatür taramalarından edinilen bilgiye göre mikrobiyal olarak elde edilen kitinaz enzimi çok geniş pH aralıklarında yüksek aktivite gösterebilmektedir. Bu geniş spektrum kullanım alanları açısından çeşitlilik sağlamaktadır. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen verilere göre enzim aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Yüksek enzim aktivitesi sayesinde daha az enzim üretimi yapılarak, hem maliyet düşürülebilir hemde verim arttırılabilir.

5. SONUÇ

Tokat Almus Baraj gölü tabanının 11 farklı bölgesinden toprak örnekleri alındı. Toprak örnekleri dilüsyon yapıldıktan sonra MHA besiyerine ekildi, saflaştırıldı ve bu işlemlerden sonra 130 farklı bakteri suşu elde edildi.

Çalışmada üç farklı kitin türünden elde edilen kolloidal kitin ile çalışıldı. Bu kitin türleri; Standart kitin, böcek ekzo iskeletlerinden elde edilen kitin (crab shells) ve fungal hiflerden elde edilen kitindir. Bu 130 bakteri suşu, üç farklı kolloidal kitin türüyle hazırlanan CHDA besiyerlerine ekildikten sonra, standart kolloidal kitin ile hazırlanan CHDA besiyerinde en fazla ve en etkili sayıda clear zone oluşumu meydana geldiği gözlemlendi. Standart kolloidal kitin kullanılarak hazırlanan CHDA besiyerinde üreme meydana gelen 60 bakteri suşunun, saf kültürleri matriks içerisine stoğa alındı ve çalışmalara bu bakteri suşları içerisinde güçlü clear zone oluşumu gösteren 12 bakteriden, en güçlü zone veren 6 tanesi seçilerek devam edildi.

En güçlü clear zone oluşumu gösteren 6 bakteri örneği kısmı olarak saflaştırıldıktan sonra bu kısmi saflaştırılan enzim preparasyonları CHDA besiyerinde durham tüpü ile açılan kuyucuğa damlatıldı. 72 saat boyunca dört saatte bir hidroliz zonaları ölçüldü ve sonunda en fazla zone veren bakterilerin B-98, B-123 ve B-124 numaralı bakteri suşları olduğu belirlendi. Aynı 6 bakterinin DNS ile kitinaz aktivitesi ölçüldüğü zaman en yüksek absorbans değerlerinin yine B-98, B-123 ve B-124 numaralı bakteri suşlarına ait olduğu belirlendi. Bu iki aktivite ölçüm deneyinde de daha aktif etki göstermiş olan bu üç bakteri suşu ile deneylere devam edildi.

Bradford metodu ile enzim aktivitesi en yüksek olan üç bakterinin protein miktarları belirlendi ve sonucunda B-98 kodlu bakteri için protein miktarı: 0.2905 mg/ ML, B-123 kodlu bakteri için protein miktarı: 0.2412 mg/ML ve B-124 kodlu bakteri için protein miktarı: 0.3025 mg/ ML olarak bulundu.

Optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi için yapılan deneyler sonucunda B-98 için optimum pH: 9.0, B-123 için optimum pH: 10.5, B-124 için optimum pH: 8.5 olarak belirlendi. Optimum sıcaklık değerleri ise üç bakteri içinde 40 °C olarak belirlendi. Bu sonuçlardan yola çıkarak Almus baraj gölü tabanından izole edilen bakterilerin ürettiği kitinaz enziminin bazik özellik gösterdiği ve mezofilik karakterde olduğu tespit edildi.

Enzim aktivitesi üzerine çeşitli kimyasalların etkilerinin değerlendirildiği deneyler sonucunda üç bakteri için ortak olarak bir değerlendirme yapılacak olursa; CuCl_2 , NiCl_2 ve KCl enzim aktivitelerinde artışa neden olurken, HgCl_2 enzim aktivitelerinde azalmaya neden olmuştur.

6.KAYNAKLAR

- Anonim, 2003. Mechanism of Enzyme Activity. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Enzyme> (06.03.2022).
- Anonim, 2007. Buffer Calculater. Cusabio. <https://www.cusabio.com/m-296.html#a15> (12.02.2022).
- Arabacı, N., (2011). Cold Aktif Alkalın Amilaz Enzimi Üreten Bacillus Sp. Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Asmani, K. L., Bouacem, K., Ouelhadj, A., Yahiaoui, M., Bechami, S., Mechri, S., Jabeur, F., Taleb-Ait Menguellet, K., & Jaouadi, B. (2020). Biochemical and molecular characterization of an acido-thermostable endo-chitinase from *Bacillus altitudinis* KA15 for industrial degradation of chitinous waste. *Carbohydrate research*, 495, 108089.
- Aygan A., (2008). Haloalkalofil *Bacillus* Sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Bai P. (2015). Biology of Poly (ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Molecular cell*, 58(6), 947–958.
- Castrejón-Antonio, J. E., Tamez-Guerra, P., Montesinos-Matías, R., Ek-Ramos, M. J., Garza-López, P. M., & Arredondo-Bernal, H. C. (2020). Selection of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) strains to control *Xyleborus affinis* (Curculionidae: Scolytinae) females. *PeerJ*, 8, e9472.
- Chawla S.P., Kanatt S.R., Sharma A.K. (2015) Chitosan. In: Ramawat K., Mérillon JM. (eds) *Polysaccharides*. Springer, Cham.
- Duan, Z., Shang, Y., Gao, Q., Zheng, P., & Wang, C. (2009). A phosphoketolase Mpk1 of bacterial origin is adaptively required for full virulence in the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Environmental microbiology*, 11(9), 2351–2360.
- Eagle, W.Y., (2003). The Effect Of Chitosan And Its Derivatives On The Dyeability Of Silk. (Doktora Tezi), Hong Kong Polytechnic University.
- Ferrari, A., Gaber, Y., & Fraaije, M.W. (2014). A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulase activity detection. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 37 - 37.
- Folders, J., Tommassen, J., van Loon, L. C., & Bitter, W. (2000). Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 182(5), 1257–1263.

- Ghebregzabher, M., Rufini, S., Monaldi, B., & Lato, M. (1976). Thin-layer chromatography of carbohydrates. *Journal of chromatography*, 127(2), 133–162.
- Görmez, A. (2014). Kitinaz Üreten Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamaları. Bilimsel Araştırma Projesi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Erzurum.
- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., & Javed, S. (2013). Chitinases: An update. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 5(1), 21–29.
- Karayılan, R., (2015). Kitin Deasetilaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kilis.
- Kim, T. U., Gu, B. G., Jeong, J. Y., Byun, S. M., & Shin, Y. C. (1995). Purification and Characterization of a Maltotetraose-Forming Alkaline (alpha)-Amylase from an Alkalophilic *Bacillus* Strain, GM8901. *Applied and environmental microbiology*, 61(8), 3105–3112.
- Kopparapu, N.K., Zhou P., Zhang S., Yan Q., Liu Z., Jiang Z. (2012). Purification and characterization of a novel chitinase gene from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Escherichia coli*. *Carbohydrate Research*, 347(1), 155–160.
- Kuzu, S. B., Güvenmez, H. K., & Denizci, A. A. (2012). Production of a Thermostable and Alkaline Chitinase by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Strain HBK-51. *Biotechnology research international*, 2012, 135498.
- Kuzu, S.B.,(2002). Kitinaz Üreten *Bacillus* İzolasyon, Enzimin Kısmi Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- LeClerc, G., Buchan, A., Maurer, J., Moran, M.A., et al., (2007). Comparison of chitinolytic enzymes from an alkaline, hypersaline lake and an estuary. *Env. Microbiol.*, 9, 197–205.
- Lee, Y. S., Park, I. H., Yoo, J. S., Chung, S. Y., Lee, Y. C., Cho, Y. S., Ahn, S. C., Kim, C. M., & Choi, Y. L. (2007). Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101. *Bioresource technology*, 98(14), 2734–2741.
- Loni, P. P., Patil, J. U., Phugare, S. S., & Bajekal, S. S. (2014). Purification and characterization of alkaline chitinase from *Paenibacillus pasadenensis* NCIM 5434. *Journal of basic microbiology*, 54(10), 1080–1089.
- Miller G.L.,(1951). Use Of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination Of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. Vol. 31(3):426-428.

- Oyar P., (2016). Diş Hekimliğinde Kitin ve Kitosan. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, Erzurum.
- Ozdemir, Zafer. (2014). Kitin; Kitosanın Fonksiyonel Özellikleri ve Kullanım Alanları. Kırklareli Üniversitesi Teknoloji Fakültesi. 44. 104-117.
- Patil, R. S., Ghormade, V., V. & Deshpande, M. V. (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and microbial technology*, 26(7), 473–483.
- Pleban, S., Chernin, L., Shet, I., (1997). Chitinolytic activity of endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Lett. Microbiol.*, 25, 284-288.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V, Jeon, Y. (1999). Food Application of Chitin and Chitosans. *Trends in food science & technology*. Vol. 10(2):37-51
- Singh, J., Batra, N., & Sobti, R. C. (2004). Purification And Characterisation Of Alkaline Cellulase Produced By A Novel Isolate, *Bacillus Sphaericus* JS1. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 31(2), 51–56.
- Tolan M., (2015). Mikrobiyal Kökenli Proteaz Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Tsujibo, H., Yoshida, Y., Miyamoto, K., Imada, C., Okami, Y., & Inamori, Y. (1992). Purification, properties, and partial amino acid sequence of chitinase from a marine *Alteromonas* sp. strain O-7. *Canadian journal of microbiology*, 38(9), 891–897.
- Underkofler, L. A., Barton, R. R., & Rennert, S. S. (1958). Production of microbial enzymes and their applications. *Applied microbiology*, 6(3), 212–221.
- Wen, C.M., Tseng, C.S., Cheng, C.Y., Li, Y.K. (2002). Purification, Characterization And Cloning Of A Chitinase From *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotechnol Appl Biochem*. Jun;35(3):213-9.
- Wiwat, C., Siwayaprahm, P., & Bhumiratana, A. (1999). Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1. *Current microbiology*, 39(3), 134–140.
- Yılmaz G., (2019). Antifungal Ajan Adayı Olarak Bakteriyal Kitinaz Üretimi ve Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat
- Zarei, M., Aminzadeh, S., Zolgharnein, H., Safahieh, A., Noghabi, K. ve Ghoroghi, A. (2011). Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. *J. Microbiol.*, 42, 1017–1029.
- Zhang, X., Yuan, J., Li, F., & Xiang, J. (2021). Chitin Synthesis and Degradation in Crustaceans: A Genomic View and Application. *Marine drugs*, 19(3), 153.

Zhang, Y., Zhou Z., Liu, Y., Cao, Y., He, S., Huo F., Qin, C., Yao, B. ve Ringo E. (2014). High-yield production of a chitinase from *Aeromonas veronii* B565 as a potential feed supplement for warm-water aquaculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 1651–1662.



7.ÖZGEÇMİŞ

