



T.C.  
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Burcu DURMAZ**

**KİTİNAZ ÜRETEN BAKTERİLERİN  
İZOLASYONU VE ENZİM ÜRETİMİNİN  
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE  
ARTTIRILMASI**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**OSMANIYE – 2016**

**T.C.  
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİTİNAZ ÜRETEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE  
ENZİM ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE  
ARTTIRILMASI**

**Burcu DURMAZ**

**BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**OSMANIYE  
MAYIS-2016**

## TEZ ONAYI

### KİTİNAZ ÜRETEB BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE ENZİM ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARTTIRILMASI

Burcu DURMAZ tarafından Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN danışmanlığında Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalı'nda hazırlanan bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN .....  
Biyoloji Anabilim Dalı, OKÜ

**Üye:** Prof.Dr. Hüsniye AKA SAĞLIKER .....  
Biyoloji Anabilim Dalı, OKÜ

**Üye:** Yrd.Doç.Dr. Makbule BAYLAN .....  
Su Ürünleri Anabilim Dalı, ÇÜ

Yukarıdaki jüri kararı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ..... /..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdullah Ali GÜRTEN .....  
Enstitü Müdürü, **Fen Bilimleri Enstitüsü**

Bu Çalışma OKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: OKÜBAP-2014-PT3-005

*Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.*

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, bu çalışma sonucunda elde edilmeyen her türlü bilgi ve ifade için ilgili kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını ve bu tezin Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Burcu DURMAZ

## ÖZET

### KİTİNAZ ÜRETEEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE ENZİM ÜRETİMİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARTTIRILMASI

Burcu DURMAZ

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

Mayıs 2016, 64 sayfa

Bu çalışmada, Hatay ili Erzin ilçesi kıyı kesimlerinden toplanan ve deniz canlısı kabukları içeren toprak numunelerinden üç adet kitinolitik *Bacillus* sp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bakteriler sırasıyla *Bacillus* sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 olarak isimlendirilmişlerdir. Her üç izolata ait kitinaz da optimum aktivitesini 40 °C'de göstermişlerdir. Yine DBK1 kitinazı optimum aktivitesini pH 7.0'de, DBK2 ve DBK3 kitinazları ise pH 6.0'da göstermişlerdir. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait spesifik aktiviteler 40 °C'de sırasıyla 6.61, 13.17 ve 8.65 U/mg olarak gerçekleşmiştir. İzolatlar en yüksek düzeyde enzim üretimini inokülasyondan itibaren DBK1, DBK2 ve DBK3 için sırasıyla 48., 36. ve 60. saatte gerçekleştirmişlerdir. İzolatların EtBr ile muamelesi sonucunda DBK1'den DBK1-M3 ve DBK1-M4, DBK2'den DBK2-M3, DBK2-M4 ve DBK2-M5, DBK3'den ise DBK3-M3 ve DBK3-M4 mutant varyeteleri elde edilmiştir. DBK1-M3, DBK1-M4, DBK2-M3, DBK2-M4, DBK2-M5, DBK3-M3 ve DBK3-M4 mutant varyeteleri kendi yabancı tip varyetelerine göre sırasıyla %146, 193, 192, 121, 136, 178 ve 116 oranlarında enzim üretmişlerdir. DBK1 kitinazı için, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> ve CuSO<sub>4</sub>, DBK2 kitinazı için MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> ve KCl, DBK3 kitinazı için ise MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> ve ZnCl<sub>2</sub> aktivatör olarak belirlenmiştir. HgCl<sub>2</sub> tüm yabancı varyetelere ait kitinazları kuvvetli bir şekilde inhibe etmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus* sp., kitinaz, izolasyon, karakterizasyon, mutasyon, EtBr

## ABSTRACT

### ISOLATION OF CHITINASE PRODUCING BACTERIA AND INCREASING OF ENZYME PRODUCTION BY MOLECULAR METHODS

Burcu DURMAZ  
M.Sc., Department of Biology  
Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

May 2016, 64 Pages

In the present study, three chitinolytic *Bacillus* strains were isolated from the soil samples containing shells of crustaceans collected from the coast sediments of Erzin district of Hatay province. The isolates were entitled as *Bacillus* sp. DBK1, DBK2, and DBK3, respectively. The optimum enzyme activities were observed at 40 °C for all chitinases. On the other hand, optimum pH value for DBK1 chitinase was 7.0, whereas 6.0 for DBK2 and DBK3 chitinases. The specific activities of DBK1, DBK2, and DBK3 chitinases were 6.61, 13.17 and 8.65 U/mg at 40 °C, respectively. Maximum enzyme productions of isolates were observed after 48, 36, and 60 hours later from inoculation for DBK1, DBK2, and DBK3 isolates, respectively. Mutant varieties DBK1-M3 and DBK1-M4 from DBK1, DBK2-M3, DBK2-M4 and DBK2-M5 from DBK2, and DBK3-M3 and DBK3-M4 from DBK3 were obtained after EtBr treatment. DBK1-M3, DBK1-M4, DBK2-M3, DBK2-M4, DBK2-M5, DBK3-M3 and DBK3-M4 have produced 146, 193, 192, 121, 136, 178 and 116% more chitinase according to their own wild type strains, respectively. The activators for DBK1 chitinase were MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, and CuSO<sub>4</sub>, for DBK2 chitinase were MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> and KCl, and for DBK3 chitinase were MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> and ZnCl<sub>2</sub>. HgCl<sub>2</sub> strongly inhibited all wild type chitinases.

**Key Words:** *Bacillus* sp., chitinase, isolation, characterization, mutation, EtBr

*Çok kıymetli aileme...*

## TEŞEKKÜR

Bu çalıőmanın yűrűtűlmesinin her aőamasında deęerli bilgilerini bizlerle paylaőan, kullandıęı her kelimenin hayatıma kattıęı önemini asla unutmayacaęım saygıdeęer danıőman hocam Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN'a öncelikle teőekkűrű bir borç bilirim.

Çalıőmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen arkadaőım Emine ÜSTÜNER'e ve çalıőma sűresince tűm zorlukları benimle gęűsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan deęerli aileme sonsuz teőekkűrlerimi sunarım.

Ayrıca blűmdeki çalıőmalarım sűresince beni destekleyen blűműműzűn dięer ęretim elemanlarına ve arkadaőlarıma teőekkűr ederim.

Bu alıőma Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Birimi tarafından OKŪBAP-2014-PT3-005 nolu proje ile desteklenmiő olup, ilgili birime de katkılarından dolayı ayrıca teőekkűrlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
TEZ BİLDİRİMİ	
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İTHAF SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Endüstriyel Enzimlerin Üretim Kaynakları.....	1
1.2. <i>Bacilluslar</i> ve <i>Bacillus</i> Kökenli Enzimler.....	2
1.3. Kitin ve Kitinaz Enzimleri.....	2
1.3.1. Bakteriyel Kitinazlar.....	4
1.3.2. Fungal Kitinazlar.....	5
1.3.3. Bitki Kitinazları.....	5
1.3.4. Böcek Kitinazları.....	6
1.3.5. Memeli Kitinazları.....	6
1.4. Mutasyon ve Mutajenler.....	8
1.4.1. Nitröz Asit (HNO <sub>2</sub> ).....	10
1.4.2. Etil Metansülfonat (EMS).....	11
1.4.3. N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG).....	11
1.4.4. Baz Analogları.....	11
1.4.5. Akridinler.....	12
1.4.6. Radyasyon.....	13
1.5. AMAÇ.....	13
1.6. KAPSAM.....	13
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	15
2.1. Kitinolitik Bakteri İzolasyonu Üzerine Yapılmış Önceki Çalışmalar.....	15
2.2. Bakterilerde Mutasyon Üzerine Yapılmış Önceki Çalışmalar.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22

3.1. Materyal .....	22
3.1.1. Bakteri Materyali .....	22
3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler .....	22
3.1.3. Alet ve Cihazlar.....	23
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu ve Kitinaz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	24
3.2.2. Mutasyon Çalışmaları .....	26
3.2.3. Enzimatik Analizler .....	27
3.2.4. Etanol Presipitasyonu İle Enzimin Hazırlanması.....	28
3.2.5. Enzimlere Ait Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi .....	28
3.2.6. Enzimlere Ait Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi .....	29
3.2.7. Enzimlere Ait Sıcaklık Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi .....	29
3.2.8. Enzimlere Ait pH Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi .....	30
3.2.9. Çeşitli Kimyasalların Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi.....	30
3.2.10. Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	31
3.2.11. Oransal Aktivite .....	31
3.2.12. Mutant Varyetelere Ait Oransal Aktiviteler.....	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	33
4.1. Kitinaz Üreten Bakterilerin İzolasyonu .....	33
4.2. İzolatlara Ait Enzimatik Özelliklerin Belirlenmesi.....	34
4.2.1. Enzimlerin Optimum pH Değerleri.....	34
4.2.2. Enzimlerin Optimum Sıcaklık Değerleri .....	36
4.2.3. Enzimlerin pH Stabiliteleri .....	37
4.2.4. Enzimlerin Sıcaklık Stabiliteleri .....	39
4.2.5. Zamana Göre Enzim Aktiviteleri .....	40
4.2.6. Enzimlerin Oransal ve Spesifik Aktiviteleri .....	41
4.2.7. Bazı Kimyasalların Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi.....	43
4.2.7.1. Kimyasalların DBK1 Kitinazı Üzerine Etkisi.....	43
4.2.7.2. Kimyasalların DBK2 Kitinazı Üzerine Etkisi.....	43
4.2.7.3. Kimyasalların DBK3 Kitinazı Üzerine Etkisi.....	44
4.2.7.4. Mutant Varyantlara Ait Kitinaz Aktivite Düzeyleri.....	47
4.2.7.5. Mutant Varyantlara Ait Spesifik Enzim Aktivite Düzeyleri.....	51
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	52

5.1. Sonuçlar .....	52
5.2. neriler .....	53
KAYNAKLAR .....	54
ÖZGEÇMİŞ .....	64

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kitinaz enzimlerini üreten bazı türler .....	7
Çizelge 1.2. Mutajenler, fonksiyonları ve meydana getirdikleri genetik değişimler ...	9
Çizelge 4.1. <i>Bacillus</i> sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait spesifik aktivite değerleri .....	42
Çizelge 4.2. Yabancıl tip izolatlar ile mutant varyantların spesifik aktivite düzeyleri	51

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kitin polisakkaritinin molekül yapısı.....	3
Şekil 1.2. Kabuklu canlılarda kitinin yapısal organizasyonu.....	3
Şekil 1.3. Selüloz, kitin ve kitosanın yapısal farklılıkları .....	3
Şekil 1.4. Nitröz asit ile mutagenesiz.....	10
Şekil 1.5. Etil metansülfonatın molekül yapısı .....	11
Şekil 1.6. N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidinin molekül yapısı.....	11
Şekil 1.7. 5-BrU'in tautomerik formları. ....	12
Şekil 1.8. 2-Amino purinin kimyasal yapısı. ....	12
Şekil 1.9. EtBr'ün kimyasal yapısı.....	12
Şekil 3.1. Deniz kıyısından toprak numunelerinin alınması .....	22
Şekil 3.2. Çalışmanın yürütüldüğü OKÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'ndan bir görüntü.....	23
Şekil 3.3. Toprak numunelerinde bulunan vejetatif bakterilerin pastörizasyonu.....	25
Şekil 3.4. <i>Bacillus</i> sporlarının LB besiyerinde çimlendirilmesi .....	25
Şekil 3.5. Çimlenmiş <i>Bacillus</i> sporlarının LB-agar plaklarında kolonileştirilmesi ...	26
Şekil 3.6. İzolatların EtBr ile muamele edilmesi .....	27
Şekil 4.1. Kitin içeren LB-agar plaklarında izolatlara ait kitinaz aktivite zonları .....	33
Şekil 4.2. <i>Bacillus</i> sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait pH optimum grafiği... ..	34
Şekil 4.3. <i>Bacillus</i> sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait sıcaklık optimumu grafiği.....	36
Şekil 4.4. <i>Bacillus</i> sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait pH stabilite grafiği. ...	38
Şekil 4.5. <i>Bacillus</i> sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait sıcaklık stabilite grafiği.....	39
Şekil 4.6. <i>Bacillus</i> sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait aktivite/zaman grafiği.....	41
Şekil 4.7. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarının oransal aktivite grafiği.....	42
Şekil 4.8. Bazı kimyasalların DBK1 kitinazı üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.9. Bazı kimyasalların DBK2 kitinazı üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.10. Bazı kimyasalların DBK3 kitinazı üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.11. EtBr muamelesi sonucunda koloni gelişimi tamamlanan plakların görüntüsü .....	48

Şekil 4.12. <i>Bacillus</i> sp. DBK1 ile mutant varyantlarının enzim üretim düzeylerinin oransal karşılaştırma grafiği .....	48
Şekil 4.13. <i>Bacillus</i> sp. DBK2 ile mutant varyantlarının enzim üretim düzeylerinin oransal karşılaştırma grafiği .....	49
Şekil 4.14. <i>Bacillus</i> sp. DBK3 ile mutant varyantlarının enzim üretim düzeylerinin oransal karşılaştırma grafiği .....	50

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\mu$ l	Mikrolitre
2-AP	2-Amino purin
5-BrU	5-Bromourasil
A,T, G, C	Adenin, Timin, Guanin, Sitozin
dk	Dakika
EDTA	Etilendiaminotetraasetik asit
EMS	Etil metansülfonat
EtBr	Ethidium bromide
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Luria besiyeri
l	Litre
LB	Luria Bertani
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	milimolar
MNNG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MW	Moleküler ağırlık
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
rpm	Dakikada devir sayısı
sp.	Tür
spp.	Türleri
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
U/mg	Ünite/miligram
U/ml	Ünite/mililitre
UV	Ultraviole
V	Volt
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim

$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre



## 1. GİRİŞ

Enzimler kısaca hücrelerdeki metabolik faaliyetleri yöneten katalizörler olarak tanımlanabilirler. Özellikle son yarım yüzyıl içerisinde bir takım avantajlarından dolayı endüstriyel uygulamalarda geleneksel işlemlere göre daha fazla kullanım alanı bulmuştur. Reaksiyon sırasında düşük miktarlarda atık oluşturmaları, çevre kirliliğine daha az yol açmaları, reaksiyonları daha uygun ve ekonomik koşullarda gerçekleştirebilmeleri bu avantajlarından bazılarıdır. Bunlara ilave olarak, mikrobiyal kökenli enzimlerin daha ekonomik üretimi, daha uzun süre kullanılabilmesi, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin endüstriyel alanlarda tercih edilmesinin diğer sebepleri arasındadır (Gümüsel, 2002).

### 1.1. Endüstriyel Enzimlerin Üretim Kaynakları

Günümüzde tanımlanmış ve karakterizasyonu yapılmış enzimlerin sayısı birkaç bini bulmaktadır. 1980 yılında bu enzimlerin yaklaşık 30 tanesi ticari boyutlarda üretilmekte ve kullanılmakta iken, günümüzde bu rakam çok fazla sayıda artmıştır ve her geçen yıl daha da artmaktadır. Enzimler mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar olmak üzere başlıca üç üretim kaynağına sahiptir. Enzimlerin üretim kaynakları içerisinde mikroorganizmalar en büyük paya sahip olup, %90'a yakını bu organizmaların fermantasyonu ile gerçekleşmektedir (Godfrey ve West, 1996). Enzim üretiminde mikroorganizmaların bu denli yüksek bir orana sahip olması, modifiye edilmiş mikroorganizmaların kullanımını teşvik etmiştir. Bu nedenle genetik mühendisliği yöntemleri ile rekombinant bakteriler geliştirilmiş ve enzim üretiminde yerlerini almıştır. *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae* gibi bakteri ve funguslar enzim üretiminde en yaygın kullanılan mikroorganizmalardır (Glazer ve Nikaido, 1995).

Bitkisel kökenli enzimlere örnek olarak proteazlardan papain, bromelain ve ficin, soya fasulyesi lipoksigenazı ve tahıl amilolitik enzimleri verilebilir. Bitkisel kökenli enzimlerin artan talebe karşılık verebilmesi, toprak işleme etkinliği, gelişim döngüsü ve iklim gibi birkaç faktöre bağlıdır. Ayrıca tarımsal etkinlikleri kontrol eden ulusal ve uluslararası politik kuruluşların çalışmaları da önemli bir faktör olarak görülmektedir (Godfrey ve West, 1996).

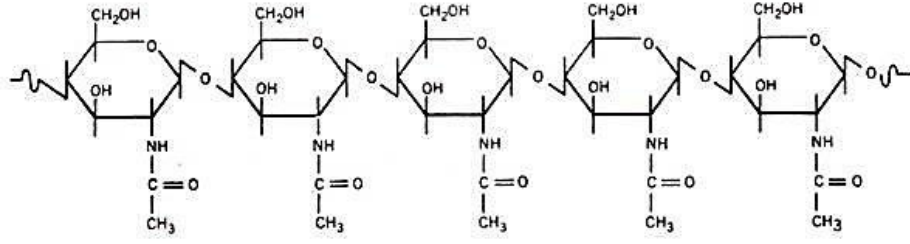
Hayvansal kökenli enzimlere ise pankreatik lipaz ve proteazlar, pepsinler, pregastrik esterazlar ve rennetler örnek olarak verilebilir. Bitkisel kökenli enzimlerin üretiminde olduğu gibi hayvansal kökenli enzimlerin üretiminde de, kesim için yetiştirilen hayvanları kontrol eden politik ve tarımsal kuruluşların izledikleri politikalar etkin rol oynamaktadır. Buna ilave olarak birçok ülkede yerli ticari hayvan popülasyonlarının korunması, hayvanların ve hayvansal dokuların bir ülkeden diğerine taşınmasında katı kuralların uygulanması diğer kısıtlamalardır. Diğer taraftan hastalıkların (özellikle viral hastalıkların) hayvanlar ve hayvansal dokular vasıtasıyla bir ülkeden diğerine yayılması büyük endişelere sebep olmaktadır. Bütün bu sebepler hayvan ve hayvansal ürün ticaretini oldukça kısıtlamaktadır. Bitkisel ve hayvansal kökenli enzimlerin üretilmesinde karşılaşılan bu sorunlar mikrobiyal kökenli enzimlere olan ilginin artırmasını sağlamıştır (Godfrey ve West, 1996).

### **1.2. *Bacillus*lar ve *Bacillus* Kökenli Enzimler**

Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %75'i hidrolitik olup büyük bir kısmı *Bacillus* suşları tarafından üretilmektedir (Harwood, 1992). *Bacillus* suşları endospor oluşturan, çomak şeklinde, patojen olmayan ve doğada hemen her yerde bulunan Gram (+) bakterilerdir (Harwood, 1992; Özcan, 1996a). Patojen olmamaları ve çeşitli endüstriyel enzimleri üretmelerinden dolayı gen klonlama çalışmalarında önemli bir yere sahip olan *Bacillus* suşları, sentezledikleri enzimleri hücre dışına salgılaya yeteneğindedirler. *Bacillus*'lar tarafından sentezlenen başlıca enzimler arasında  $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -amilaz, ksilanaz, alkalın fosfataz, selülaz, glukoz izomeraz,  $\beta$ -laktamaz, nötral proteaz, kitinaz ve pullulanaz gibi enzimler sayılabilirler (Harwood, 1992).

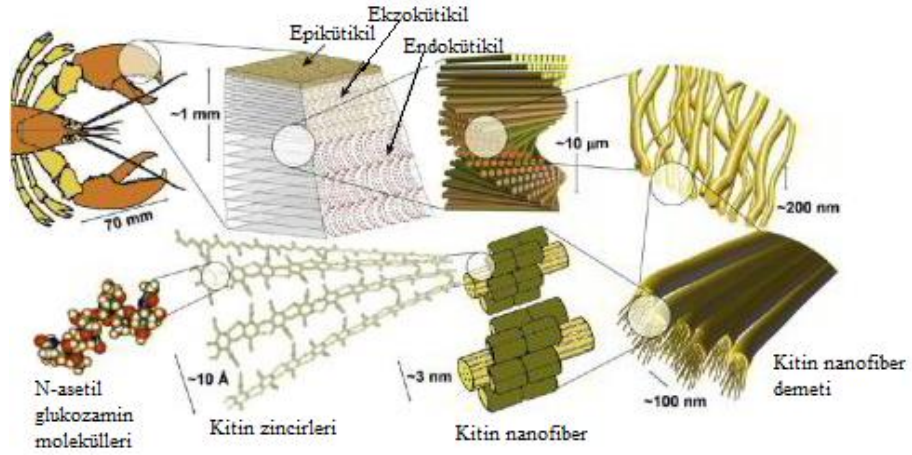
### **1.3. Kitin ve Kitinaz Enzimleri**

Kitin doğada en fazla bulunan polimerlerden olup N-asetil glukozamin rezidülerinin  $\beta$ ,1-4 bağlanması ile oluşmuş bir polisakkarittir (Şekil 1.1). Bu polisakkaritler doğada oldukça yaygın olup böceklerin dış iskelet yapılarında, *Crustacea*'ların kabuklarında, birçok mantar ve hücre duvarında yapısal element olarak bulunmaktadır (Şekil 1.2) (Chanpen vd., 1999).



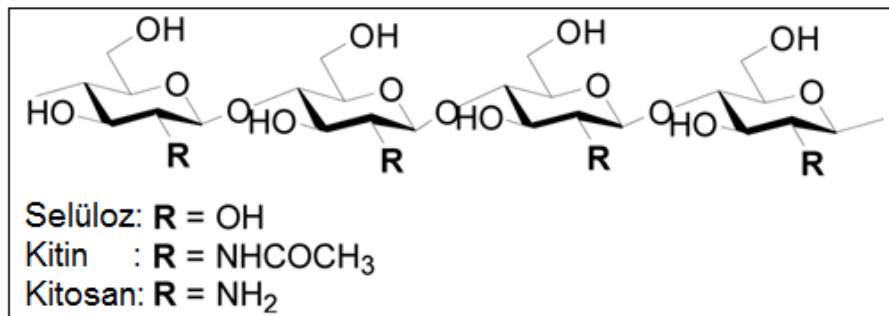
Şekil 1.1. Kitin polisakkaritinin molekül yapısı

(<http://www.biologydiscussion.com/notes/useful-notes-on-polysaccharides-with-diagram/3132>)



Şekil 1.2. Kabuklu canlılarda kitinin yapısal organizasyonu (Raabe vd., 2005)

Kitin ile selülozun molekül yapısı uzun düz zincirler ihtiva etmeleri sebebiyle benzerdir. Selüloz molekülü, yapısında hidroksil grupları içerirken, kitin molekülü bundan farklı olarak asetilasyona uğramış amino grupları içerir (Şekil 1.3) (Stryer, 1988, Madigan vd., 1997). Kitosan da benzer şekilde kabuklularda bulunan bir polimer olup aynı kitin gibi kalsiyumu bağlar ve proteinlerle kovalent bağlar oluştururlar.



Şekil 1.3. Selüloz, kitin ve kitosanın yapısal farklılıkları (Ifuku, 2014)

Kitinazlar (EC 3.2.1.14) endo- ve ekzo- tip enzimler olup kitini depolimerize ederler (Donderski ve Brzezinska, 2005). Kitinazlar özellikle fungal patojenlerin hücre duvarında bulunan kitini parçalayarak, fungal kaynaklı birçok bitki hastalığının biyolojik kontrolünde hayati bir rol oynarlar (Mathivanan vd., 1998). Bu özelliği ile kitinazlar doğal bir fungusid özelliği taşımaktadırlar. Kitinazların bakteriler, mantarlar, böcekler, kabuklular, yüksek bitkiler ve bazı omurgalılar arasında oldukça yoğun bir dağılım gösterdiği bildirilmiştir (Jeuniaux, 1966; Flach vd., 1992). Kitin içeren tüm organizmalar, büyük ihtimalle hücre duvarının ve dışiskeletin morfojenezi için, kitinaz enzimi de üretmektedir (Gooday, 1977). Kitin içermeyen diğer kitinolitik organizmalar ise besin elde etmek için polimerlerin degradasyonu amacıyla kitinaz üretirler (Roberts ve Selitrennikoff, 1988). Kitinolitik toprak bakterilerinin habitatlarında bulunan kitini parçalamak üzere kitinazı üretmesi buna güzel bir örnektir (Oranusi ve Trinci, 1985). Bitkiler, hücre duvarlarında kitin bulunmamakla birlikte, kendilerini kitin içeren fungus ve böcek gibi parazitlerden korumak için kitinaz enzimlerini ürettikleri tahmin edilmektedir (Abeles vd., 1971; Bell, 1981; Boller, 1985). Üretim kaynaklarına göre kitinazlar başlıca bakteriyel, fungal, bitki, böcek ve memeli kitinazları olarak sınıflandırılabilir.

### 1.3.1. Bakteriyel Kitinazlar

Kitinazlar; *Serratia*, *Chromobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*; *Clostridium*, *Vibrio*, *Arthrobacter*, *Beneckea*, *Aeromonas* ve *Streptomyces* gibi bir çok bakteri grubunun içerisinde dağılım göstermiştir (Matsumoto, 2006). Bakteriyel kitinazlarda substrat bağlanma bölgesi enzimin ya aminoterminal ya da karboksiterminal bölgesi içerisinde lokalize olmuştur. Şu ana kadar izole edilmiş ve sekanslanmış bakteriyel kitinazların çoğu glikozil hidrolazların familya 18'ine aitken, *Streptomyces griseus* IIUT 6037'ye ait kitinaz (C-1) familya 19'a ait rapor edilmiştir (Onho, vd., 1996). Bakteriyel kitinazların moleküler ağırlıkları 20-60 kDa arasında olup bu değerler böcek kitinazlarından (40-85 kDa) küçük, bitki kitinazları (25-40 kDa) ile benzerdir (Bhattacharya vd., 2007). Bakteriyel kitinazların aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerleri enzim üreten bakteriye bağlı olarak değişmekle birlikte geniş bir aralık göstermektedir. Örneğin *Streptomyces violaceusniger* tarafından üretilen endokitinaz ve *Streptomyces thermoviolaceus* tarafından üretilen termostabil kitinazların optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 28 ve 80 °C'dir. Yine benzer şekilde *Streptomyces*

*thermoviolaceus* tarafından üretilen kitinaz enziminin optimum pH aralığı 8.0-10.08 iken *Stenotrophomonas maltophilia* C3 bakteri tarafından üretilen kitinazın optimum pH aralığı 4.5-5.0'dir (Hamid vd., 2013). Bakterilerin kitinaz enzimini çoğunlukla nitrojen ve karbon kaynağı sağlamak amacıyla ürettiği düşünülmektedir. Buna ilave olarak bazı bakterilerce üretilen kitinaz enzimleri (örneğin *Serratia marcescens* ve *S. plymuthica* kitinazları) bazı fitopatogenik fungusların sebep olduğu bitki hastalıklarına karşı potansiyel biyolojik kontrol ajanıdır (Dempsey vd., 1998). Tüm bunlara ilave olarak *Aeromonas* sp. No. 10S-24, *Pseudomonas aeruginosa* K-187, *Bacillus circulans* WL-12 gibi bazı bakterilerde çoklu kitinaz enzim üretimi de tanımlanmıştır.

### **1.3.2. Fungal Kitinazlar**

Fungal kitinazlar bakteriyel kitinazlarda olduğu gibi beslenme, morfogenez ve fungal gelişim işlemlerinde önemli bir rol üstlenmektedir. Kitin fungal hücre duvarlarının temel bileşenlerinden biridir. Fungal kitinazlar sınıf-3 bitki kitinazları ile büyük oranda aminoasit homolojisi gösterirler. Çoğunlukla fungal kitinazlar glikozil hidrolaz süper familyası içinde familya 18'in üyeleridirler. Fungal kitinazlar bakteriyel ve bitki kitinazları gibi iyi derecede sınıflandırılmamış olup, familya 18'e ait bakteri ve bitki kitinazlarına benzerlikleri temel alınarak tanımlanmıştır (Hamid vd., 2013).

### **1.3.3. Bitki Kitinazları**

Kitinazlar bitkilerin tohumlarında, saplarında, yumrularında ve çiçeklerinde dokuya spesifik olarak bulunabilmektedir. Bitkiler tarafından üretilen kitinaz enzimleri bitkileri patojen mikroorganizmalara karşı korumak için önemli bir rol üstlenmişlerdir. Hatta tarımsal biyoteknoloji çalışmaları ile kitinaz enzimlerinin bitkilere klonlanması neticesinde patojenlere dirençli hale getirilmiş transgenik bitki hatlarının oluşturulması güncelliğini korumaktadır. Bitkiler tarafından üretilen kitinaz enzimleri bitki gelişiminin erken safhasında tespit edilebilir olup bitki kitinazları böcek kitinazlarının aksine genellikle endokitinaz yapısındadırlar (Matsumoto, 2006).

#### 1.3.4. Böcek Kitinazları

*Bombyx mori* ve *Manduca sexta* tarafından üretilen kitinazlar özellikle deri değiştirme sırasında parçalayıcı enzim olarak önemli bir rol üstlenmektedirler. Deri değiştirme esnasında kitinaz enzimlerinin üst deriyi hidrolizi sonucu açığa çıkan monomerler yeni kütikülün sentezlenmesi esnasında tekrar kullanılırlar. Buna ilave olarak böcekler tarafından kitinazlar ayrıca böcekleri kendi parazitlerine karşı koruma rolü de üstlenmiştir. Böceklerde kitinaz enzimleri ayrıca karides ve *Krill* gibi kabuklu canlılar tarafından da üretilmektedir (Matsumoto, 2006).

#### 1.3.5. Memeli Kitinazları

Memeli kitinazlarının; enzimatik aktivitesi olmayan protein benzeri kitinazlar ve enzimatik olarak aktif gerçek kitinazlar olmak üzere iki gruba ayrılan familya 18'e (Glikozil hidrolaz, GH18) ait olduğu bildirilmiştir. Kitotriosidaz tanımlanan ilk memeli kitinazıdır. Kitin yapısında bulunan  $\beta$ -(1-4) glikozodik bağların hidrolizinde glutamik asit temel bir rol oynamaktadır. Protein benzeri kitinlerde glutamik asitin yerine glutamin, lösin ve izolösinin gelmesi sonucu kitinolotik aktivite özelliği kaybolmuştur (Hamid, vd., 2013).

Bazı türlere ait kitinaz enzimleri ile bu enzimlerin amino asit sekanslarına Gen Bank Erişim numaraları Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Kitinaz enzimlerini üreten bazı türler (Kawashima vd., 2016)

Tür	GenBank erişim numarası
<i>Serratia marcescens</i> (ChiA protein öncülü)	X03657
<i>Lethenteron japonicum</i> (kitinaz, karaciğer)	EU741679
<i>Rattus norvegicus</i> (kitotriosidaz, dalak)	DQ286232
<i>Mus musculus</i> (kitotriosidaz, dil)	AY458654
<i>Equus caballus</i> (kitotriosidaz)	EF694759
<i>Homo sapiens</i> (kitotriosidaz)	U29615
<i>Paralichthys olivaceus</i> (kitinaz 3, pankreas)	AB121734
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (kitinaz, birincil böbrek)	AJ535688
<i>Bufo japonicus</i> (kurbağa pankreatik kitinaz, pankreas)	AJ345054
<i>Xenopus tropicalis</i> [kitinaz 1 (kitotriosidaz), tüm vücut]	BC075332
<i>Sardinops melanostictus</i> (kitinaz 2, mide)	AB985611
<i>Pagrus major</i> (kitinaz 2, hepatopankreas)	AB678430
<i>Parapristipoma trilineatum</i> (kitinaz 2, mide)	AB642678
<i>Paralichthys olivaceus</i> (kitinaz 2, mide)	AB121733
<i>Epinephelus coioides</i> (kitinaz 2)	FJ169894
<i>Sebastes marmoratus</i> (kitinaz 2)	AB686659
<i>Gallus gallus</i> (CBPch04, grandular mide)	AB071038
<i>Bos taurus</i> (kitin bağlayıcı protein b04, karaciğer)	AB051629
<i>Homo sapiens</i> (asidik memeli kitinazi)	AF290004
<i>Macaca fascicularis</i> (asidik memeli kitinazi)	FJ685619
<i>Rattus norvegicus</i> (kitinaz öncül-benzeri, mide)	AY486074
<i>Mus musculus</i> (asidik kitinaz, mide)	EF094027
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (gastrik kitinaz)	EU877960
<i>Sardinops melanostictus</i> (kitinaz 1, mide)	AB985610
<i>Paralichthys olivaceus</i> (kitinaz 1, mide)	AB121732
<i>Sebastes marmoratus</i> (kitinaz 1)	AB686658
<i>Parapristipoma trilineatum</i> (kitinaz 1, mide)	AB642677
<i>Morone saxatilis</i> (gastrik kitinaz)	EU048546
<i>Epinephelus coioides</i> (kitinaz 1)	FJ169895

Kitinaz geninin aktarılması ile elde edilen ve funguslara karşı bağışıklık özelliği kazandırılan transgenik bitkilerin üretimi ile fungusid kullanımı kısıtlanmakta ve böylece çevre kirliliği ile mücadelede ciddi katkı sağlamaktadırlar. Öte yandan fungus, kabuklu ve böceklerde bulunan kitinazlar bu organizmaların modifikasyonunda rol oynarlar (Shubakov ve Kucheryavykh, 2004).

Kitinaz enzimleri endokitinaazlar, ekzokitinaazlar ve kitobiazlar olmak üzere üç yapısal gruba ayrılmaktadır (Dubourdieu vd., 1985). Endokitinaazlar kitin polimerlerini içten parçalarken, ekzokitinaazlar kitobiozu uç kısımdan uzaklaştırırlar. Beta-N-asetil glikozaminidaz, N-asetil glikozamin monomerlerini kitinden çıkarır, bu durumda kitobiaz da kitobiozu N-asetil glikozamine hidroliz eder.

Karides üretim işletmelerinde açığa çıkan atıkların kimyasal kompozisyonu incelendiğinde %27 kitin, %40 protein ve %33 mineral içerdiği görülmektedir. Açığa çıkan bu karides atıkları bazı ülkelerde üretilen kitin ve kitosanın ham maddesini oluşturmaktadır. Üretilen bu kitin ve kitosan gıda, eczacılık, tıp ve suların arıtılması (Allans vd., 1984; Muzarelli vd., 1986; Kuzu, 2008) ile kültür besi yerlerinde katkı maddesi olarak (Stephens vd., 1976), hayvansal besinlerin hazırlanmasında protein ve pigment ekstraksiyonu için (Oke vd., 1978), toprakta nematod popülasyonunun azaltılmasında (Brown vd., 1982), tek hücre proteini üretiminde (Revah-Moiseu ve Carroad, 1981) ve enzim immobilizasyonunda (Chen ve Weng, 1983) kullanımı da yaygındır (Kuzu, 2008).

#### **1.4. Mutasyon ve Mutajenler**

Mutasyon bir canlının DNA diziliminde meydana gelen kalıcı değişimler olup, spontan olarak hücre içinde meydana gelebileceği gibi, in vitro koşullarda mutajen ajanların kullanımı ile de oluşturulabilirler. Mutasyona sahip bir organizma ise mutant olarak adlandırılır

In-vitro mutasyon çalışmalarında mutajenlerin seçimi rastgele olmayıp hedefe göre seçilmesi kritik aşamalardan birisidir. Ethidium bromide (EtBr) akrinin grubu bir mutajen olup özellikle istenmeyen genlerin köreltilmesinde en sık kullanılan mutajen ajanlardan biridir. Buna ilave olarak özellikle kanser araştırmalarında ve hiper üretici endüstriyel mikroorganizmaların geliştirilmesinde Ety-methanesulphonate (EMS) ve N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) de yaygın olarak kullanılmaktadır (Hopwood, 1970).

Bakteri popülasyonlarında mutasyonların spontan olarak meydana gelme oranı  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  arasındadır. Bu, 1 adet mutant koloni bulabilmek için 100.000-1.000.000



koloninin taranması anlamına gelmektedir. Mutant bakteri suşlarını elde etmek için laboratuvar ortamlarında bu kadar fazla koloniyi taramak mümkün değildir. Bu sebeple, laboratuvarlarda mutasyon frekansını yükseltmek için kimyasal ve fiziksel mutajen ajanlar kullanılmaktadır.

Kimyasal ve fiziksel mutajenler, fonksiyonları ve meydana getirdikleri genetik değişimler Çizelge 1.2.'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Mutajenler, fonksiyonları ve meydana getirdikleri genetik değişimler  
(Alikhanian, 1962)

		Mutajen ajan	Fonksiyonu	Genetik değişim
Kimyasal ajanlar	Baz analogları	5-Brom urasil (5-BrU)	Yapısal olarak timine benzemesine karşın guanin ile eşleşme yapar	A-T→G-C
		2-aminopurin (2-AP)	Yapısal olarak adenine benzemesine karşın sitozin ile eşleşme yapar	A-T→G-C G-C→A-T
	DNA ile kimyasal reaksiyona girenler	Nitrous asit (HNO <sub>2</sub> )	Adenin ve sitozinin deaminasyonu	A-T↔G-C
		Hydroksilenazamine (NH <sub>2</sub> OH)	Sitozin ile reaksiyona girer	G-C→A-T
	Alkilleyici ajanlar	Ethyl methanesulfonate (EMS)	Guaninin üzerine metil grubu bağlar ve timin ile eşleşmeye neden olur	G-C→A-T
		Nitrojen mustards, mitomyosin, nitrosoguanidin	Guaninin N7 pozisyonundaki azotu alkilleyerek deoksiribozit bağlantısını gevşetirler	Nokta mutasyonu ve delesyon
Akridinler	Ethidium bromid (EtBr)	Baz eklenmesi veya çıkarılması ile çerçeve kaymasına neden olurlar	Çerçeve kayması	
Fiziksel ajanlar	Radyasyon	Ultra viyolet (UV)	Primidin dimerleri oluşturur	Çerçeve kayması
		Ionize radyasyon, X ışınları	DNA'ya bağlanarak zincir kırılmasına neden olur	Delesyon

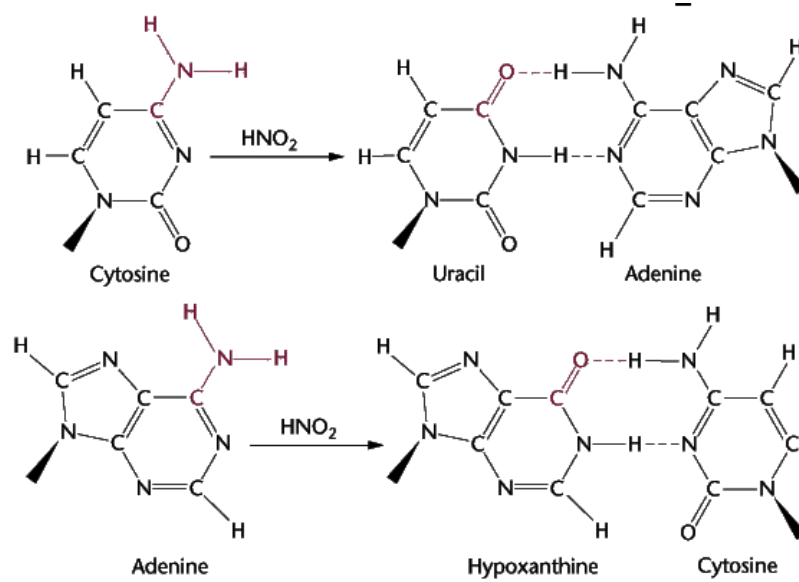
Kimyasal ajanlar etki şekillerine göre üç gruba ayrılırlar (Hopwood,1970):

1. DNA molekülünde bulunan pürin ve primidinin bir veya bir kaçının kimyasal yapısını değiştiren nitrous asit ve alkilleyici ajanlar (EMS, EES, DES, NTG).

2. Nükleik asitin replikasyonu esnasında yeni sentezlenen zincire yerleşerek bazların tautomerik formlarında olduğu gibi yanlış baş eşleşmelerine neden olan baz analogları.
3. Çerçeve kayması mutasyonlarına neden olan akridinler ve ICR gibi nitrojen mustard derivasyonları.

#### 1.4.1. Nitröz Asit ( $\text{HNO}_2$ )

Nitröz asit, oksidatif deaminasyon ile amino gruplarını enol ve keto gruplarına dönüştürmektedir. Sonuçta sitozin, adenin ve guanin sırasıyla urasil, hipoksantin ve ksantine dönüştürülür. Bu dönüşümler neticesinde urasil adenin ile baz eşleşmesi yaparak GC  $\rightarrow$  AT transisyonu, hipoksantin sitozinle baz eşleşmesi yaparak AT  $\rightarrow$  GC transisyonu ve ksantin de adenin ile baz eşleşmesi yaparak AT  $\rightarrow$  GC transisyonu meydana gelir (Şekil 1.4).

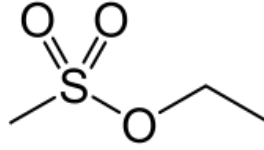


Şekil 1.4. Nitröz asit ile mutagenesiz (Klug ve Cummings, 1997)

### 1.4.2. Etil Metansülfonat (EMS)

Etil metansülfonat (EMS,  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{C}_2\text{H}_5$ ) (Şekil 1.5), DNA molekülünde nükleotid ikamesi ile rastgele mutasyonlar üreten mutajen bir bileşik olup genellikle tek nokta mutasyonları meydana getirmektedir.

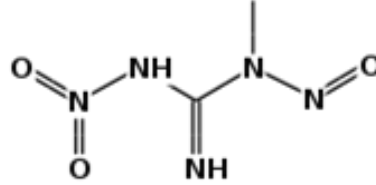
EMS'nin etil grubu guanin bazı ile reaksiyona girerek O-6-etilguanini oluşturur. Bu, DNA replikasyonu sırasında O-6-etilguaninin karşısına sitozin yerine timin bazının gelmesi anlamını taşır. Sonuçta G:C baz çiftinin yerini bir A:T baz çifti alır.



Şekil 1.5. Etil metansülfonatın molekül yapısı

### 1.4.3. N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)

MNNG ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_5\text{O}_3$ ) (Şekil 1.6),  $\text{N}^7$  pozisyonuna alkil grubu bağlayarak ( $\text{N}^7$ -Etilguanin) etki eden oldukça kuvvetli bir mutajendir.

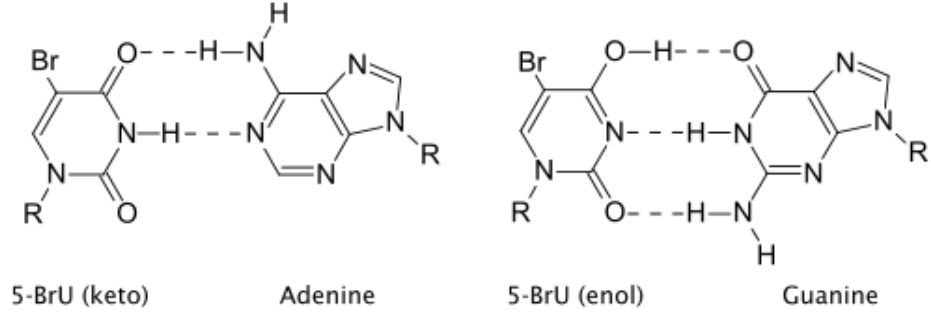


Şekil 1.6. N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin molekül yapısı

### 1.4.4. Baz Analogları

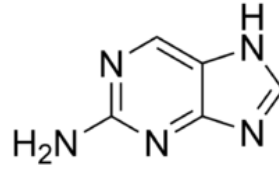
Nükleik asitlerin biyosentezi sırasında, pürin ve pirimidinlerin yerine geçebilen moleküller olup pürin ve pirimidin bazlarından hangisine benziyorsa, replikasyon sırasında benzerinin yerine geçerek mutasyona neden olmaktadır.

5-Bromourasil (5-BrU), metil grubu yerine brom atomu içermesi sebebiyle timin analogu gibi davranmaktadır. 5-BrU, keto formunda adenin, enol formunda ise guanin ile eşleşir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. 5-BrU'nin tautomerik formları

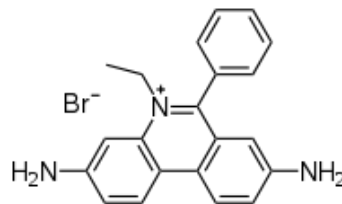
2-Aminopürin (2-AP) adenin bazının analogu olup timin ile eşleşme yapmaktadır. Ayrıca replikasyon esnasında sitozin ile de eşleşerek olası transisyonlara yol açmaktadır (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. 2-Amino purinin kimyasal yapısı

#### 1.4.5. Akridinler

Genomda çerçeve kayması mutasyonlarına sebep olan ve laboratuvarlarda en fazla kullanılan, oldukça kuvvetli mutajen ajanlardır. Ethidium bromind (EtBr) en iyi bilinen akridinlerdendir (Şekil 1.9 ).



Şekil 1.9. EtBr'ün kimyasal yapısı

Etkilerini çerçeve kayması mutasyonuna suretiyle gösterirler (Crik vd., 1961). T2 ve T4 fajlarında mutasyon etkilerinin yüksek olması, akrininlerin mutasyon etkisi ile rekombinasyon mekanizması arasında bir ilişki olduğunu düşündürmüştür (Orgel ve Brenner, 1961).

#### **1.4.6. Radyasyon**

Ultraviyole (UV) ışınları bakterilerde gerek baz değişimleri gerekse delesyona sebep olan mutasyonlar meydana getirmektedir. Ayrıca nadiren de olsa çerçeve kayması mutasyonlarına da sebep olabildiği bildirilmiştir (Berger vd., 1966). Diğer taraftan X-ışınları da in vitro çalışmalarda mutasyon amacıyla bakteri ve virüslerde mutasyonlar meydana getirmek amacıyla kullanılmaktadır (Brown, 1966).

### **1.5. AMAÇ**

Bu çalışmanın amacı kabuklu canlıların bulunduğu alanlardan kitinolitik *Bacillus* türü bakterilerin izolasyonlarını gerçekleştirmek, bu bakterilerce üretilen kitinaz enzimlerinin moleküler biyoloji yöntemleriyle üretimlerinin artırılması imkanlarını araştırmak, son olarak bu enzimlerin karakterizasyonunu gerçekleştirmektir.

### **1.6. KAPSAM**

Çalışmanın kapsamı aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Deniz kıyısı veya su ürünleri işleyen işletmeler gibi kitinolitik aktiviteye sahip bakterilerin bulunabileceği alanlardan toprak numunelerini almak ve bu numunelerden kitinaz enzimlerini üreten *Bacillus* sp. bakterilerinin izolasyonunu gerçekleştirmek.
2. Toprak numunelerini 80 °C'de 10 dk süreyle inkübe ederek vejetatif hücreleri öldürmek (pastörizasyon).
3. Pastörize edilmiş numunelerden belirli miktarlarda LB zengin besiyerine aktararak bakteri sporlarını aerobik ortamda çimlendirmek.

4. Çimlenen bakterilerin LB-agar plaklarında koloni oluşturmalarını sağlamak.
5. Herbir koloniyi kolloidal kitin içeren LB-agar plađına aktararak kitinaz aktivitesine sahip bakterileri aktivite zonuna göre belirlemek.
6. Enzimlerin kısmi karakterizasyonunu gerçekleştirmek (sıcaklık optimumu, pH optimumu, sıcaklık direnci, pH stabilitesi, zamana göre enzim aktivitesi, enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kitinolitik Bakteri İzolasyonu Üzerine Yapılmış Önceki Çalışmalar

Perrakis vd., (1994), tütünden saflaştırdıkları kitinazı klonlamışlardır.

Brurberg vd., (1996), *Serratia marcescens* tarafından üretilen ChiA ve ChiB enzimlerini karakterize etmişler, her iki enzimin de optimum pH'sının 5.0-6.0, sıcaklık optimumunun 50-60 °C olduğunu, 6.1 pH ve 37 °C sıcaklık değerlerinde yarı-ömürlerinin 10 günden fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Huang vd., (1996), koloidal yengeç-kabuğu kitinini ana karbon kaynağı olarak kullanan kitinaz enzimi üreten *Aeromonas* sp. No. 16 suşunu izole etmişlerdir. Araştırmacılar enzimin 500 ml hacimli erlende 1.4 U/ml<sup>-1</sup> düzeyde aktivite gösterirken, 5 l hacimli fermentörde 1.5 U/ml<sup>-1</sup> düzeyde aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Wang ve Chang, (1997), *Pseudomonas aeruginosa* K-187 bakterisinden moleküler ağırlıkları 30.000 ve 32.000 dalton olan iki adet kitinaz enzimini (FI ve FII kitinaz) saflaştırmışlardır. Araştırmacılar FI ve FII için pI değerlerini sırasıyla 5.2 ve 4.8, optimum pH değerlerini 8.0 ve 7.0, optimum sıcaklık değerlerini 50 °C ve 40 °C, pH stabilitelerini 6.0-9.0 ve 5.0-10.0, sıcaklık stabilitelerini ise 50 ve 60 °C olarak bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar her iki enzimin de aktivitesinin Cu<sup>2+</sup> ile arttığını, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> ile kuvvetli bir şekilde inhibe olduğunu bildirmişlerdir.

Bhushan, (2000), alkalofilik bir çevreden izole ettiği *Bacillus* sp. BG-11 bakterisini araştırmıştır. Araştırmacı bakterinin kitin içeren bir ortamda, 50 °C'de ve 72 saatlik periyotta 76 U/ml<sup>-1</sup> kitinaz ürettiğini, saflaştırdığı kitinazın moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 41 kDa, optimum pH'sının 8.5, optimum sıcaklığının ise 50 °C olduğunu bildirmiştir. Araştırmacı ayrıca kitinazın KCl, sodyum metabisülfid, sodyum azid varlığında 4°C'de raf ömrünün 8 hafta olduğunu da bildirmiştir.

Vaidya vd. (2003), *Alcaligenes xylosoxydans*'dan elde ettikleri kitinazın moleküler ağırlığını yaklaşık 44-45 kDa, optimum sıcaklık ve pH değerlerini sırasıyla 50 °C ve 5.0 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca 5 mM konsantrasyonlarındaki Cu<sup>+2</sup> ve

Na<sup>+</sup>'un kitinaz aktivitesini %25 inhibe ederken, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> ve Ba<sup>+2</sup>'nin etkisiz kaldığını bildirmişlerdir.

Shubakov ve Kucheryavykh, (2004), *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Sporotrichium*, *Beaureia* ve *Mucor* olmak üzere 9 adet mantar türü ve cinsinin kitinolitik aktivitelerini çalışmışlar, bunların %1 kitin içeren sıvı besiyerlerinde üretildiğinde 0.2 U/mg (*Sporotrichium olivaceum*, *Mucor sp*) ile 4.0-4.2 U/mg (*Trichoderma lignorum*, *Aspergillus niger*) arasında aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Yuli vd., (2004), Endonezya'nın Tompaso sıcak su kaynağından kitinolitik aktiviteye sahip, 16S rRNA sekans analizine göre *Bacillus sp* (*Bacillus sp.* 13.26) olarak tanımladıkları bakteriyi izole etmişlerdir. Araştırmacılar bakterinin %5 kitin içeren besiyerinde 55 °C'de 72 saat süreyle inkübe edildiğinde ekstrasellüler kitinaz enzimini ürettiğini, moleküler ağırlığının 60 kDa, optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 60°C ve 7.8 olduğunu bildirmişlerdir.

Dahiya vd. (2005), *Enterobacter sp.* NRG4 bakterisinin 60 kDa molekül ağırlığına sahip, kolloidal kitini ve glikol kitini hidrolize eden, buna karşılık kitozani hidrolize edemeyen ekstrasellüler kitinazı bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 45 °C ve 5.5 olduğunu, Mg<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup>'un enzim üzerinde stümitatör, Cu<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Ag<sup>+</sup> ve Hg<sup>+2</sup>'nin ise inhibitör olduklarını bildirmişlerdir.

Lee vd., (2007), *Bacillus sp.* DAU101 suşu genomunda bulunan kitinaz genini *Escherichia coli*'de klonlamışlardır. Araştırmacılar, optimum pH'sını 7.5 ve optimum sıcaklığını 60 °C olarak belirledikleri enzimin Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve Hg<sup>+2</sup> metal iyonlarınca kuvvetli bir şekilde inhibe olduğunu, buna karşılık aktivitesinin Co<sup>+2</sup> ile 1.4 kat arttığını bildirmişlerdir.

Fleuri vd., (2009), *Cellulosimicrobium cellulans* 191 bakterisinin erlen içerisinde 25 °C'de 200 rpm çalkalama hızında inokülasyon periyodunun 72. saatinde 6.9 U/ml ile en yüksek enzim üretim düzeyine ulaştığını, 5 l hacimli fermentörde ise 25 °C'de 200 rpm çalkalama hızında inokülasyon periyodunun 168. saatinde 4.19 U/ml ile en



yüksek enzim üretim düzeyine ulaştığını, moleküler ağırlığının 61 kDa olduğunu ve enzimin bazı fungusların hücre duvarı ile protoplast formlarını lize ettiğini bildirmişlerdir.

Natsir vd., (2010), Endonezya sınırları içerisinde bulunan Sulili termal su kaynağından izole ettikleri *Bacillus* sp. HSA, 3-1a bakterisinin kitinaz enzimini çalışmışlardır. Araştırmacılar bakterinin optimum olarak enzim üretimini %0.5 kolloidal kitin konsantrasyonunda ve inkübasyon periyodunun 72. saatinde gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri ile substrat konsantrasyonunun sırasıyla 60 °C, 7.0 ve %0.3 olduğunu, enzimin pH 7.0 ve 60 °C koşullarında 2 saat inkübasyondan sonra stabil kaldığını, kitinaz aktivitesinin  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  varlığında arttığını, buna karşılık  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  varlığında azaldığını bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar enzimin 5 fraksiyonunun bulunduğunu ve bunların moleküler ağırlıklarının SDS-PAGE’de sırasıyla 79, 71, 48, 43, ve 22 kDa olarak belirlendiğini bildirmişlerdir.

Zeki ve Muslim (2010), izole ettikleri toplam 12 adet *Serratia marcescens* bakterisinden bir tanesinin kitinaz enzimi ürettiğini, enzimin moleküler ağırlığının 59.000 dalton, optimum sıcaklık ve pH değerlerinin ise sırasıyla 50 °C ve 6.0 olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca enzimin 5.0-7.0 pH aralığında ve 50 °C’de stabil olduğunu,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , Triton X-100 ve n-ethylmaleimide ile aktive, buna karşılık EDTA, metanol, etanol, aseton ve  $Hg^{2+}$  ile inhibe olduğunu da bildirmişlerdir.

Kuzu vd., (2012), izole ettikleri *Bacillus thuringiensis* HBK-51 suşuna ait kitinaz enziminin optimum sıcaklık ve pH değerlerini sırasıyla 110 °C ve 9.0 olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar enzimin 3 saatlik ön inkübasyondan sonra 9.0-12.0 pH aralığında ve 110 °C’de yüksek düzeyde stabil kaldığını, bu özellikleri ile enzimin hipertermofil-termostabil ve alkali olarak tanımlandığını, SDS-PAGE analizinde enzimin 50 ve 125 kDa boyutlarında 2 adet izoform gösterdiğini bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar  $Ni^{2+}$ ,  $K^+$  ve  $Cu^{2+}$ ’nın enzim aktivitesini arttırırken, EDTA, SDS,  $Hg^{2+}$  ve etil-asetimidatın azalttığını bildirmişlerdir.

Kuddus ve Ahmad, (2013), 58 bakteri izolatını taramışlar ve bu izolatlardan 6 tanesinin kitinolitik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar kitinolitik aktivite gösteren 6 adet izolat içerisinde en yüksek kitinaz üretimine sahip iki adet izolatı (*Aeromonas hydrophila* HS4 ve *Aeromonas punctata* HS6) ileri çalışmalar için seçmişlerdir. En yüksek kitinaz üretiminin HS4 suşu için 37 °C sıcaklık, 8.0 pH değeri ve 24-48 saat inkübasyon periyodunda, HS6 suşu için ise 37 °C sıcaklık, 7.0 pH değeri ve üretim inkübasyon periyodunun 48. saatinde gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar her iki izolat için de en uygun substratın koloidal kitin, en iyi karbon kaynağının nişasta (%1), en iyi nitrojen kaynağının ise HS4 için malt, HS6 için ise maya ekstraktı olarak belirlendiğini,  $Mn^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$ 'nın HS6 kitinaz üretimini,  $Co^{2+}$ 'nın ise HS4 kitinaz üretimini önemli derecede arttırdığını bildirmişlerdir.

## 2.2. Bakterilerde Mutasyon Üzerine Yapılmış Önceki Çalışmalar

Yoneda (1982), geleneksel mutasyon yöntemleri ve gen klonlama tekniklerini birleştirerek daha iyi suşlar geliştirmiştir. Araştırmacı bu türlerin seleksiyonunda antibiyotik dayanıklılık özelliğinden ve nişastalı plaklarda oluşan amilaz zonlarından faydalanmıştır. Araştırmacı kantatif enzim analizi sonucunda enzim üretiminin 1500 kat arttığını bildirmiştir.

Kole ve Altosaar, (1985), kırmızı pigmentli *Serratia marcescens* EB415 suşunu ultraviyole ışını ve nitrosoguanidine kullanarak mutasyona uğratmışlar, sonuçta pigment üretmeyen, koloidal kitin içeren besi ortamında daha büyük kitinaz aktivite zonu veren mutant BL40 varyetesini elde etmişlerdir. Araştırmacılar yabancı tip EB415 varyantı ile mutant BL40 varyantının kitinaz üretimini karşılaştırmışlar, EB415 yabancı tipin 60 U/ml kitinaz üretirken, mutant BL40 varyantının 160 U/ml (%167 artış) kitinaz enzimi ürettiğini belirlemişlerdir.

Özcan (1996a), çerçeve kayması mutasyonlarına sebep olan ethidium bromid (EtBr) uygulayarak  $\alpha$ -amilaz pozitif *Bacillus subtilis* ORBA (1) suşunu  $\alpha$ -amilaz negatif bir suş haline dönüştürmüştür. Araştırmacı 9 adet mutant suş izole etmiştir. Araştırmacı *Bacillus subtilis* ORBA (1) suşu ile mutant suşa ait hücre dışı proteinleri SDS-PAGE ve SDS-Nişasta-PAGE jellerde karşılaştırarak  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin *B. subtilis*

ORBA (1) suşunda yer alan fakat mutant suşta bulunmayan yaklaşık 65 kDa'lık bir proteinden kaynaklandığı tespit etmiştir.

Sidhu vd., (1997), *Bacillus* sp. MK716 suşunun amilaz üretiminin EMS ile mutasyon çalışmaları sonucunda 40 kat arttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar mutasyona uğrattıkları  $\alpha$ -amilaz genini *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'de klonlamışlar, *B. subtilis*'de enzim üretiminin 107 kat arttığını bildirmişlerdir.

Ibrahim ve O'sullivan (2000), probiyotik bakteriler tarafından üretilen  $\beta$ -galaktozidaz enzim miktarını arttırmak amacıyla iki bifidobakterium türü (*B. breve* ve *B. longum*) ile *Laktobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*'u iki ayrı kimyasal ajanla (EMS ve MNNG) muameleye tabi tutmuştur. Araştırmacı elde ettiği 25 adet mutant varyantda yabancı tiplerine göre  $\beta$ -galaktosidaz aktivitelerinin arttığını bildirmiştir. Araştırmacı, laktoz bulunan ortamda gelişen mutantlarda  $\beta$ -galaktosidaz artışının *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*'da %137, *S. thermophilus*'da %104, *B. brevis*'de %70 ve *B. longum*'da %222 olarak gerçekleştiğini bildirmiştir.

Kotchoni ve Shonukan (2002), soya fasulyesi fermantasyonundan izole ettikleri *Bacillus pumilis*'i EMS ile mutasyona uğratmışlar, elde ettikleri mutantları yüksek glukoz konsantrasyonunda (%2.6 w/v) selüloz üretim seviyesine göre dört gruba ayırmışlar ve grup-III ile grup-IV'ün selüloz üretiminin sırasıyla 6.2 mg ile 11.4 mg'ın üzerinde olduğunu belirlemişlerdir.

Bilgisoy, (2003), iki *Bacillus subtilis* (RSKK244, RSKK246) suşunu enzim üretimini değiştirmek amacıyla EMS ve EtBr ile mutasyona tabi tutmuş, RSKK244 ve RSKK246'nın EMS ile muamelesi sonunda 244M1, 244M2 (likenz<sup>-</sup>, kisilanz<sup>-</sup>, CMCas<sup>-</sup>,  $\alpha$ -amilaz<sup>+</sup>) ve 246M3 (likenz<sup>+</sup>, kisilanz<sup>+</sup>, CMCas<sup>-</sup>,  $\alpha$ -amilaz<sup>+</sup>) mutant varyeteleri elde etmiştir.

Vaidya vd., (2003), kitinaz üreten bakterilerin taranmasında hızlı bir metot geliştirmişler ve bu metodu *Alcaligenes xylosoxydans*'ın hiperkitinaz mutant varyetesini taramada kullanmışlardır. Araştırmacılar, mutant varyete *A. xylosoxydans* EMS 33'ün yabancı varyeteden 3.4 kat daha fazla kitinaz enzimi ürettiğini de bildirmişlerdir.

Walid vd. (2007), UV, EMS ve akrinin oranj kullanarak *Aspergillus niger* UMIP 2564'de sitrik asit üretiminin artırılmasını çalışmışlardır. Elde ettikleri 15 mutant suşun arasından, sekiz adet mutant suşun asit üretimlerinde artışın olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar W5 (UV) mutant varyetinin ebeveyn varyeteye göre yaklaşık 3.2 kat daha fazla ürün verdiğini bildirmişlerdir.

Prabakaran vd. (2009), üç mantar türünü (*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* ve *Verticillium terrestre*) şeker kamışı topraklarından izole etmişler ve bu funguslarda amilaz, selülaz ve lipaz enzimlerinin üretimini iyileştirmek amacıyla UV ışığı ile mutasyon çalışmaları yapmışlardır.

Haq vd. (2010), *Bacillus amyloliquefaciens* UNG-16 suşunu EMS ile 10-60 dakika muamele etmişlerdir. Araştırmacılar mutant *B. amyloliquefaciens* EMS-6'da ebeveyn suşun 1.4 katı yüksek enzim aktivitesi belirlemişlerdir.

Yamashiro vd. (2010), *Bacillus circulans* bakterisine ait  $\beta$ -amilase aktivitesinin iyileştirilmesini ankestral mutasyon yöntemi ile başarmışlardır.

Abdel-Aziz vd. (2011), topraktan izole ettikleri *Streptomyces pseudogriseolus* UV ışını ile muamele ederek 139 adet mutant varyant elde etmişlerdir. Araştırmacılar bu mutant varyeteleri LB-ksilan agar besi yerinde 30 °C'de üç gün üretmişler ve kongo kırmızısı ile boyadıktan sonra 94 mutant varyetinin yabancı tipe göre daha geniş aktivite zonuna sahip olduklarını, en yüksek ksilanaz aktivitesinin ise 121 numaralı mutant suşa (%161 artış) ait olduğunu bildirmişlerdir.

Raju vd. (2012), *Aspergillus niger* fungusunu UV, EMS ve EtBr ile muamele etmişler, mutant varyetelerin enzim üretim düzeylerini spektrofotometrede DNS yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar, UV-18 mutant suşun 18.11 U/ml/dk, EMS-4 mutant suşun 14.93 U/ml/dk, Ethidumbromide-13 mutant suşun 18.31 U/ml/dk ve EMS&EB-18 mutant suşun 18.84 U/ml/dk glukoamilaz ürettiklerini, bu değerlerin yabancı suşa göre 2-4 kat daha fazla glukoamilaz üretimine tekabül ettiğini bildirmişlerdir.

Reddi Pradeep vd., (2012), *Aspergillus niger* fungusunu EtBr ile mutasyona uğratarak selülaz üretimini artırmayı hedeflemişlerdir. Araştırmacılar mutasyondan sonra 10 adet mutant varyeteyi (GNEB<sub>1</sub> - GNEB<sub>10</sub>) seçerek enzim aktivitelerine bakmışlar, bu mutant varyetelerden 5 tanesinin (GNEB<sub>1</sub>, GNEB<sub>4</sub>, GNEB<sub>5</sub>, GNEB<sub>8</sub>, GNEB<sub>9</sub>) yabancı tipe göre daha yüksek enzim üretimi gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Raju vd., (2013), proteaz üreticisi *Bacillus cereus* bakterisini UV, EMS ve EtBr ile muamele ederek mutantlarda enzim üretim düzeylerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, bazı mutant varyetelerin erlen fermentasyonu sonucunda yabancı tip bakteriye göre daha fazla enzim ürettiğini bildirmişlerdir.

Kavil ve Divakar (2014), *Shigella* sp. üzerinde fiziksel (UV) ve kimyasal (apfisilin, kloramfenikol) mutasyonun etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, yaptıkları çalışmanın sonucunda yabancı varyete ile mutant varyetenin gelişimlerinin farklı olduğunu, hem kimyasal hem de fiziksel mutajen muameleleri sonucu ekstraselüler kitinaz enzimi üretiminin etkilendiğini, antibiyotik varlığında bile bakteri gelişiminin ve enzim üretiminin gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bakteri Materyali

*Bacillus* sp. DBK1, *Bacillus* sp. DBK2 ve *Bacillus* sp. DBK3 bakterileri, bu çalışma kapsamında, Hatay ili Erzin ilçesi deniz kıyısından alınan ve yoğun bir şekilde deniz kabuklusu içeren toprak numunelerinden (Şekil 3.1) elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Deniz kıyısından toprak numunelerinin alınması

##### 3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler

Çalışma kapsamında kullanılan tüm kimyasal ve diğer sarf malzemeler aksi belirtilmedikçe Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Ambresco, Axygen, Brand, Eppendorf, Fırat Plastik ve İsolab'dan satın alma yoluyla temin edilmiştir. Kolloidal kitin ise kitinden (Sigma; C9752) aşağıda verilen protokol uyarınca hazırlanmıştır (Kuddus ve Ahmad, 2013):

1. 40 g kitin 600 ml hacimli konsantre HCl içerisine yavaşça ilave edilmiş ve 30 °C'de 60 dk süreyle yüksek hızda karıştırılmıştır.
2. 2 l hacimli su 4-10 °C'de yavaşça ilave edilerek kitinin kolloidal kitin süspansiyonu olarak çökmesi sağlanmıştır.
3. Çökelti kâğıt filtreden geçirilerek süspansiyon toplanmıştır.

4. Süspansiyon bir beherin içinde 5 l saf suda yıkanarak tekrar bir kağıt filtre yardımıyla toplanmıştır. Bu adım 3 kere daha tekrarlanarak süspansiyonun pH değerinin yaklaşık 3.5 olması sağlanmıştır.
5. Hazır hale gelmiş olan koloidal kitin substrat olarak kullanılmıştır.

### 3.1.3. Alet ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan inkübatörler (Nüve ve Memmert), su banyoları (Memmert), santrifüj (Hettich), manyetik karıştırıcı (Ika), vorteks (Ika), pH metre (Hanna), otoklav (Hirayama), saf su cihazı (Labor Şimşek), buzdolapları (Arçelik), çalkalayıcı (Ika), elektroforez takımı ve güç kaynağı (Atto) çalışmanın yapıldığı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda mevcut bulunmaktadır (Şekil 3.2). Yine çalışmada kullanılan spektrofotometre (Pharmacia) ise ihtiyaç duyulduğu zamanlarda Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.



Şekil 3.2. Çalışmanın yürütüldüğü OKÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'ndan bir görüntü

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu ve Kitinaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan bakterilerin izolasyonu aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. Deniz kıyısından steril kaplara alınan ve bol miktarda deniz canlısı kabuları içeren toprak numuneleri laboratuvara taşınmıştır.
2. Toprak numunelerinden 1'er g tartılarak alınmış ve üzerlerine 10'ar ml steril saf su eklenerek iyice karıştırılmıştır. Böylece numunelerde bulunan bakteri sporlarının saf suya geçmeleri sağlanmıştır.
3. Sulandırılmış numuneler tortunun dibine çökmesi için 30 dk kadar bekletilmiş ve sonrasında sıvı kısımlardan 500'er µl alınarak 1.5 ml hacimli steril mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır.
4. Mikrosantrifüj tüplerine alınan numuneler 80 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dk süreyle inkübe edilerek vejetatif bakterilerin ölmesi sağlanmıştır (Şekil 3.3).
5. Süre sonunda numuneler su banyosundan uzaklaştırılmış ve tamamı steril mikropipetlerle 25 ml hacimli LB besiyerlerine (%10 w/v bakto tripton, %5 w/v maya ekstraktı, %10 w/v NaCl, pH 7.5) aktarılmıştır.
6. LB besiyerleri 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde orta çalkalama hızında 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve böylece bakteri sporlarının çimlenmeleri sağlanmıştır (Şekil 3.4).
7. LB sıvı besi ortamında gelişen bakterilerden 1'er ml alınarak seri sulandırmalar yapılmış ve  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  oranlarında sulandırılmış örneklerden koloidal kitin içeren LB agar besiyerlerine (%10 w/v bakto tripton, %5 w/v maya ekstraktı, %10 w/v NaCl, %10 w/v koloidal kitin, %15 w/v agar, pH 7.5) 100'er µl olacak şekilde cam çubukla yayma yöntemiyle ekimleri yapılmıştır.



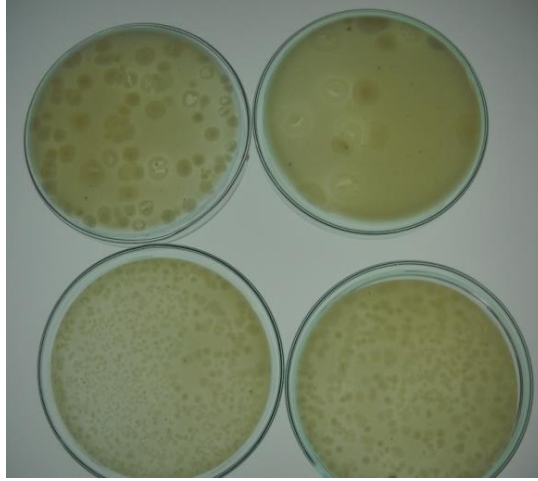
8. Ekimleri tamamlanan plaklar ters çevrilerek oda sıcaklığı koşullarında 72 saat süreyle inkübe edilmiştir (Şekil 3.5).
9. Etrafında berrak aktivite zonu bulunan koloniler kitinaz pozitif olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Toprak numunelerinde bulunan vejetatif bakterilerin pastörizasyonu



Şekil 3.4. *Bacillus* sporlarının LB besiyerinde çimlendirilmesi



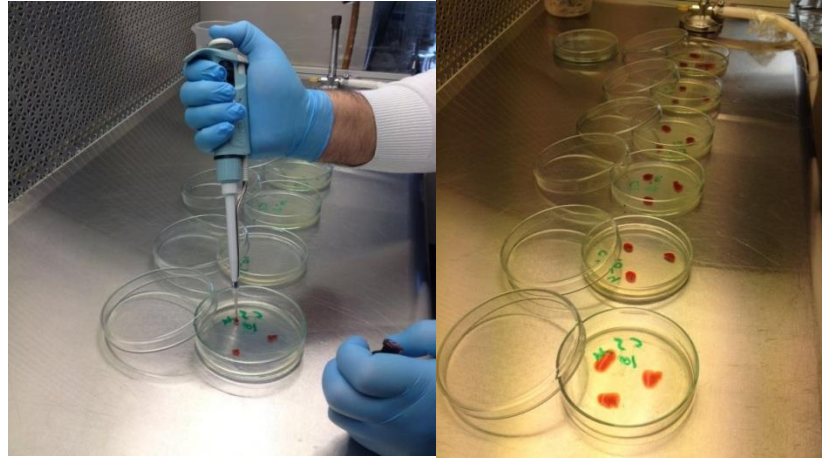
Şekil 3.5. Çimlenmiş *Bacillus* sporlarının LB-agar plaklarında kolonileştirilmesi

### 3.2.2. Mutasyon Çalışmaları

Çalışma kapsamında elde edilen izolatlar EtBr mutajeni kullanılarak mutasyona uğratılmışlardır. Mutasyon prosedürü aşağıda verilen protokol uyarınca steril kabin içerisinde yapılmıştır:

1. İzolatlar master plaklardan steril öze yardımıyla alınarak 25 ml hacimli LB sıvı besi yerlerine ekilmiş ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde orta çalkalama hızında 24 saat süreyle üremeye bırakılmışlardır.
2. Bakteriler steril mikrosantrifüj tüplerine 1'er ml olacak şekilde alınmış ve seri sulandırmalar yapılmıştır.
3.  $10^{-5}$  ile  $10^{-6}$  dilüsyonlardan 100'er µl alınarak cam çubukla yayma yöntemi ile LB-kitin-agar plaklarına ekimleri yapılmış, plakların kuruması için yaklaşık 20 dk bekletilmiştir.
4. Bakteri ekimi yapılan agar zeminine uygun mesafelerde 1'er damla EtBr (10 mg/ml) damlatılmış ve bu sefer EtBr'nin kuruması için yaklaşık 30 dk bekletilmiştir (Şekil 3.6).
5. Plaklar ters çevrilerek bakterilerin üremesi için 37 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır.

6. Süre sonunda EtBr'nin besiyeri üzerinde yayıldığı ve hiçbir bakteri üremesinin gözlenmediği ölüm zonunun kıyısında bulunan EtBr ile temas etmiş bakteriler steril kürdanlarla tek tek toplanarak LB-kitin-agar plaklarına numaralandırılarak ekilmişlerdir.
7. Ekimi tamamlanan plaklar ters çevrilerek oda sıcaklığında 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır.
8. Süre sonunda koloniler etrafındaki kitinaz aktivite zonları göz önünde bulundurularak, 1 adet küçük zon büyüklüğüne sahip (negatif kontrol), 4 adet ise büyük zon büyüklüğüne sahip olmak üzere her bir izolat için 5'er adet mutant varyete seçilmiştir.
9. Seçilen mutant varyeteler enzimatik analizlerde kullanılmak üzere, master ve gliserol stokları alınarak uygun saklama koşullarında (master plaklar için +4 °C, gliserol stoklar için -20 °C)'de muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.6. İzolatların EtBr ile muamele edilmesi

### 3.2.3. Enzimatik Analizler

Enzimatik analizler Kuzu (2008)'de verilen protokol uyarınca yapılmıştır. Protokolün bazı aşamalarında modifikasyonlar uygulanmıştır.

### **3.2.4. Etanol Presipitasyonu İle Eenzimin Hazırlanması**

Etanol presipitasyonu ile enzimlerin hazırlanması aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır.

1. Bakteriler master plaklardan 50 ml hacimli LB sıvı besiyerlerine steril öze yardımıyla inoküle edilerek 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde uygun çalkalama hızında 24 saat süreyle üremeye bırakılmışlardır.
2. Süre sonunda bakteriler steril santrifüj tüpleri yardımıyla 5000 rpm hızında +4 °C'de santrifüj edilerek pelet haline getirilmişlerdir.
3. Santrifüj sonrası enzimleri içeren hücre dışı sıvı kısımlar (süpernatant) kaba filtre kâğıdı (Whatman, 5) ile süzölmüş ve üzerine hacmin %70'i oranında %96'lık soğuk etanol eklendikten sonra -20 °C'de 24 saat süreyle bekletilmiştir.
4. Süre sonunda örnekler +4 °C'de 10000 rpm'de çöktürölmüştür.
5. Çökeltiler 0.1 M sodyum fosfat (pH 7.0) tamponunda çözülererek +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen enzim preparasyonları, enzimlere ait sıcaklık optimumu, sıcaklık direnci, pH optimumu, pH direnci, zamana göre enzim aktivitesi, metal iyonlarının enzim aktiviteleri üzerine etkisi deneylerinde kullanılmıştır.

### **3.2.5. Enzimlere Ait Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi**

Enzimlerin aktivite gösterdiği optimum pH değerlerinin belirlenmesinde;

Sitrat (pH 4.0-6.0)

Sodyum fosfat (pH 6.0-8.0)

Glisin-NaOH (pH 8.0-10.0)

Boraks-NaOH (pH 10.0-13.0) tamponları kullanılmıştır.

Her bir pH değerine sahip tampondan 1 ml alınarak 1 ml enzim preparasyonu ile karıştırılmıştır. Bu karışımların her birine 5 mg kitin-azur (200 mg kitin azur 100 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 6.5) içinde çözüldükten sonra renkli şişede +4 °C'de saklanmıştır) ilave edildikten sonra 37 °C'de (bakterinin üretildiği sıcaklık) 30 dk süreyle bekletilmişlerdir. Kör, kitin azur ve tampon kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında örneklerdeki enzim aktiviteleri 560 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak enzimlere ait pH aktivite grafikleri oluşturulmuştur.

### **3.2.6. Enzimlere Ait Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi**

Enzimlere ait sıcaklık optimum değerlerinin belirlenmesinde, 1 ml enzim preparasyonu 1 ml sodyum fosfat tamponu (DBK1 enzimi için pH 7.0, DBK2 ve DBK3 enzimleri için pH 6.0; enzimlere ait optimum pH değerleri) ile karıştırılmıştır. Bu karışımların her birine 5 mg kitin-azur ilave edildikten sonra sırasıyla 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C sıcaklık değerlerinde 30'ar dk inkübe edilmişlerdir. Kör, kitin azur ve tampon kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında karışımlar santrifüj edilmiş ve enzim aktiviteleri 560 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak enzimlere ait sıcaklık aktivite grafikleri oluşturulmuştur.

### **3.2.7. Enzimlere Ait Sıcaklık Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi**

Enzimlere ait sıcaklık stabilite değerlerinin belirlenmesi amacıyla, enzim preparasyonları ayrı olacak şekilde 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C'lerde 30 dk süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 1 ml enzim preparasyonu 1 ml sodyum fosfat tamponu (DBK1 enzimi için pH 7.0, DBK2 ve DBK3 enzimleri için pH 6.0; enzimlere ait optimum pH değerleri) ile karıştırılmıştır. Bu karışımların her birine 5 mg kitin-azur ilave edildikten sonra sırasıyla 40 °C sıcaklık değerinde (enzimlere ait optimum sıcaklık değeri) 30'ar dk inkübe edilmişlerdir. Kör, kitin azur ve tampon kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında karışımlar santrifüj edilmiş ve enzim aktiviteleri 560 nm dalga boyunda

köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak enzimlere ait sıcaklık stabilite grafikleri oluşturulmuştur.

### **3.2.8. Enzimlere Ait pH Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi**

Enzim içeren tampon çözelti santrifüj edilerek enzim preparasyonları elde edilmiştir. Sonrasında preparasyonlar farklı pH değerlerindeki (7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 13.0) tampon çözeltiler içinde resüspanse edilerek 30 dk süreyle ön inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında, ön inkübasyona bırakılan enzimler ile substrat (kitin azur, 5 mg) karıştırılarak 40 °C sıcaklık değerinde 30'ar dk inkübe edilmişlerdir. Kör, kitin azur ve tampon kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında karışımlar santrifüj edilmiş ve enzim aktiviteleri 560 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak enzimlere ait pH stabilite grafikleri oluşturulmuştur.

### **3.2.9. Çeşitli Kimyasalların Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi**

Farklı kimyasal malzemelerin enzim aktiviteleri üzerine etkilerini belirlemek amacıyla EDTA, HgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, KCl, CuSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub> kimyasalları 1 mM konsantrasyonlarında kullanılmıştır. Bu amaçla, 1 ml enzime söz konusu kimyasallar son konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler 1'er ml sodyum fosfat tamponu (DBK1 enzimi için pH 7.0, DBK2 ve DBK3 enzimleri için pH 6.0) ve 5'er mg substrat (kitin-azur) ilave edildikten sonra 40 °C'de 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. Kör, sadece kitin azur ve tampon kullanılarak hazırlanmıştır, herhangi bir kimyasal ilavesi yapılmamıştır. İnkübasyon sonrasında enzim aktiviteleri 560 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak yukarıda belirtilen kimyasalların enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

### **3.2.10. Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Zamana göre enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla LB sıvı besiyerinde 12 saat süreyle üretilmiş olan bakteri kültürlerinden 50'şer ml hacimli yeni sıvı besiyerlerine %1 olacak şekilde (500 µl) inoküle edilmiş ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde orta çalkalama hızında üremeye bırakılmışlardır. İnkübasyonun başlangıcından itibaren her 12 saatte bir numune alınmış ve etanol presipitasyonu ile enzim örnekleri hazırlanmıştır. Bu işlem inkübasyondan itibaren 72. saate kadar her 12 saatte bir (12, 24, 36, 48, 60, 72) tekrarlanmıştır. 1 ml enzim preparasyonu 1 ml sodyum fosfat tamponu (DBK1 enzimi için pH 7.0, DBK2 ve DBK3 enzimleri için pH 6.0; enzimlere ait optimum pH değerleri) ile karıştırılmıştır. Bu karışımların her birine 5 mg kitin-azur ilave edildikten sonra 40 °C sıcaklık koşullarında 30 dk inkübe edilmişlerdir. Kör, kitin azur ve tampon kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında karışımlar santrifüj edilmiş ve enzim aktiviteleri 560 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak zaman göre enzim aktivite grafikleri oluşturulmuştur.

### **3.2.11. Oransal Aktivite**

Her üç izolat LB besi ortamında 24 saat üretildikten sonra elde edilen enzimler kitin azur ile optimum sıcaklık ve pH koşullarında 30 dk süreyle reaksiyona sokulmuşlardır. Kör, kitin azur ve tampon kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında karışımlar santrifüj edilmiş ve enzim aktiviteleri 560 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak üç enzimini birbirlerine göre oransal aktivite grafikleri oluşturulmuştur.

### **3.2.12. Mutant Varyetelere Ait Oransal Aktiviteler**

Her üç izolat ve mutant varyantları LB besi ortamında 24 saat süreyle üretildikten sonra elde edilen enzimler kitin azur ile optimum sıcaklık ve pH koşullarında 30 dk süreyle reaksiyona sokulmuşlardır. Kör, kitin azur ve tampon kullanılarak hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında karışımlar santrifüj edilmiş ve enzim

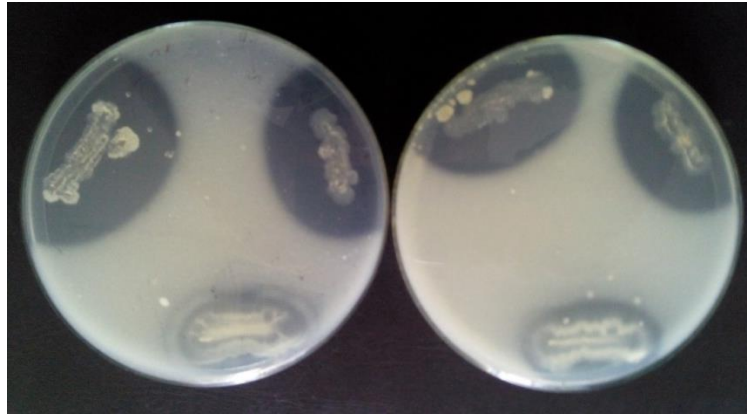
aktiviteleri 560 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir. Her seri 3 paralel olarak hazırlanmış ve ortalama değerler alınmıştır. Ölçüm değerleri kullanılarak izolatlar ile mutant varyantlara ait enzim aktivitelerinin birbirlerine göre oransal aktivite grafikleri oluşturulmuştur.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Kitinaz Üreten Bakterilerin İzolasyonu

Hatay ili Erzin ilçesi deniz kıyısından alınan ve yoğun bir şekilde deniz kabuklusu içeren toprak numunelerinden kitinaz üreten 3 adet bakteri izole edilmiştir. Bakteriler aerobik ortamda spor çimlendirme yöntemi ile izole edilmelerinden dolayı *Bacillus* sp. olarak tanımlanmışlardır. İzolatlar sırasıyla *Bacillus* sp. DBK1, *Bacillus* sp. DBK2 ve *Bacillus* sp. DBK3 olarak isimlendirilmişlerdir. %10 w/v oranında koloidal kitin içeren LB-agar besisi ortamında, oda sıcaklığı koşullarında 72 saat süreyle inkübe edilen plaklarda bakteriler kitinaz aktivite zonu üretmişlerdir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Kitin içeren LB-agar plaklarında izolatlara ait kitinaz aktivite zonları

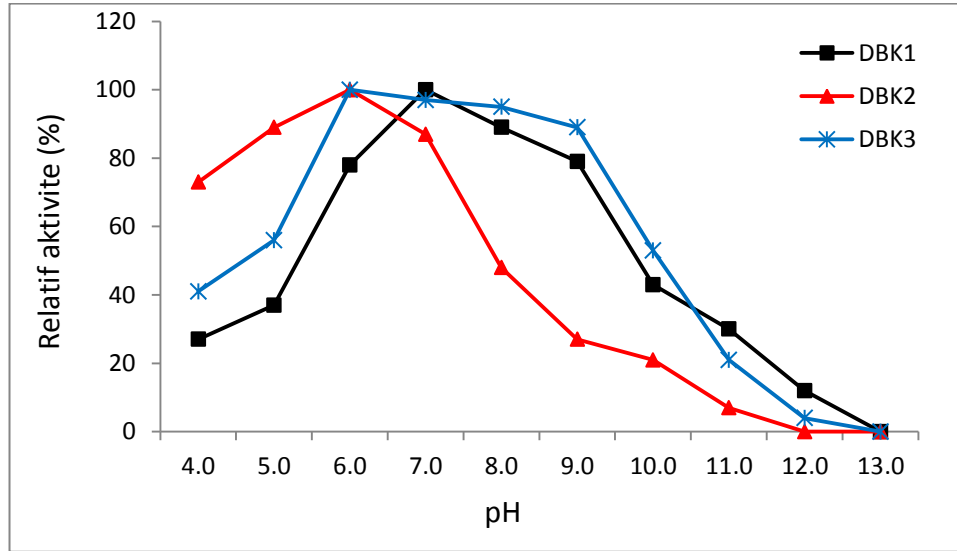
Kitinaz enzimi üretimi *Bacillus*'lar arasında yaygın olup, daha önce kitinaz enzimi üreten birçok *Bacillus* suşu değişik ortamlardan izole edilmiştir. *Bacillus* sp SCH-1 ve *Paenibacillus* SCH-2 (Han vd., 2014), *B. licheniformis* X-7u (Takayanagi vd., 1991), *B. licheniformis* suşları (Waldeck, 2006), *B. licheniformis* Mb-2 (Toharisman vd., 2005), *B. mannanilyticus* IB-OR17 (Melentiev vd., 2014), *B. amyloliquefaciens* (Sarvani ve Iyer, 2012), *B. amyloliquefaciens* V656 (Wang vd., 2002), *B. thurungiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 (Kuzu vd., 2012), *B. furmis* SBPL-05 (Loni ve Bajekal, 2011), *B. circulance* L2 ve *B. licheniformis* 2J-1 (Khan ve Khan, 2014) daha önce izole edilen ve kitinolitik aktivite gösteren *Bacillus*'lardan bazılarıdır. Bu bakterilerden bir kısmı ekstrem ortamlardan izole edilmiş olup, termofil, halofil,

alkalifil nitelite olup ve ürettikleri kitinaz enzimleri de bu doğrultuda sıcaklığa, tuz konsantrasyonlarına ve yüksek pH koşullarına karşı dayanıklıdır.

## 4.2. İzolatlara Ait Enzimatik Özelliklerin Belirlenmesi

### 4.2.1. Enzimlerin Optimum pH Değerleri

Enzimlerin aktivite gösterdikleri optimum pH değerleri *Bacillus* sp. DBK1, *Bacillus* sp. DBK2 ve *Bacillus* sp. DBK3 izolatları için sırasıyla 7.0, 6.0 ve 6.0 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *Bacillus* sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait pH optimum grafiği

DBK1 kitinazı 4.0 ve 5.0 pH değerlerinde sırasıyla %27 ve 37 oranında aktivite göstermiştir. pH 6.0'da ise ani bir artışla %78 aktivite gösterirken, pH 7.0'da en yüksek aktivite seviyesine ulaşmıştır. Enzimin, pH 8.0 ve 9.0 değerlerindeki aktiviteleri sırasıyla relatif olarak %89 ve 79 olarak belirlenmiştir. pH 10.0'da %43 aktivite gösteren enzim, pH 13.0'da aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. DBK1 kitinazı 4.0-7.0, 7.0-10.0 ve 6.0-9.0 pH aralıklarında sırasıyla %60.5, 77.75 ve 86.5 oranlarında ortalama aktivite göstermiştir. Bu verilere göre enzim nötral bir karakter göstermekle birlikte pH 6.0-9.0 arasında ideal bir aktivite sergilemektedir.

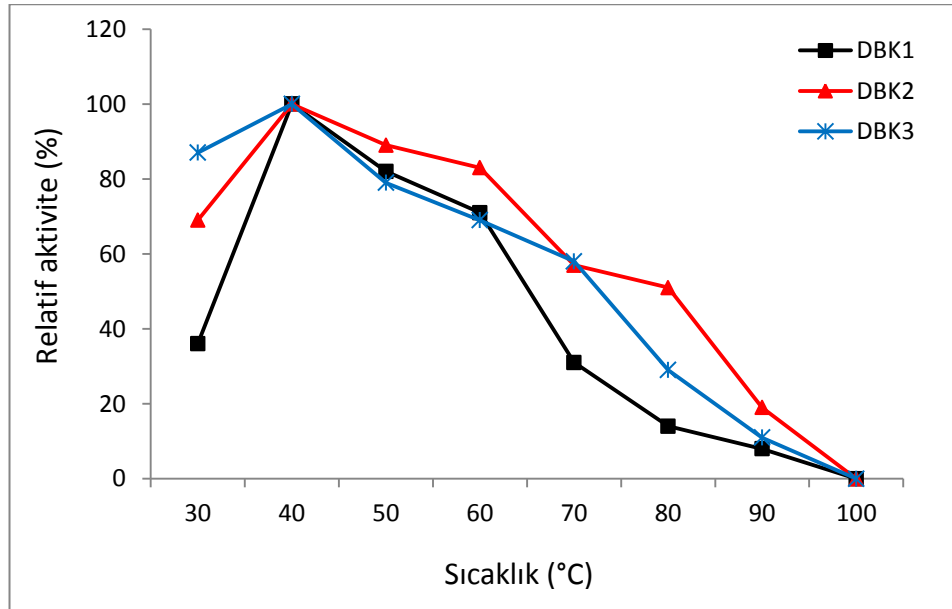
DBK2 kitinazı 4.0, 5.0 ve 7.0 pH değerlerinde relatif olarak sırasıyla %73, 89 ve 87 aktivite göstermiştir. pH 8.0'da ise %52'lik bir kayıpla %48 aktivite gösterirken, 12.0 ve 13.0 pH değerlerinde ise aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. DBK2 kitinazı 4.0-7.0 ve 7.0-10.0 pH aralıklarında sırasıyla %87.25 ve 45.75 ortalama oransal aktivite göstermiştir. Optimum pH değeri 6.0 olan enzimin 4.0 ve 5.0 pH değerlerinde de yüksek aktiviteye sahip olması, enzimin asidik karakterli bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

DBK3 kitinazı optimum aktivitesini 6.0'da göstermekle birlikte 7.0, 8.0 ve 9.0 pH değerlerinde sırasıyla %97, 95 ve 89 aktivite göstermiştir. 10.0 pH değerinde %53 aktivite gösteren enzim 12.0'de aktivitesinin %96'sını, 13.0'de ise tamamını kaybetmiştir. DBK3 kitinazı 4.0-7.0 pH aralığı ile 7.0-10.0 pH aralığında sırasıyla %73.5 ve 83.5 oranında ortalama aktivite göstermiştir. Asidik bir karaktere sahip olan DBK2 kitinazının aksine DBK3 kitinazı her ne kadar en yüksek aktivitesini 6.0 pH değerinde gösterse de, daha çok alkali pH değerlerinde yüksek ortalama aktivite oranlarına sahip olması enzimin orta düzeyde alkali bir karaktere sahip olduğunu göstermektedir.

*Bacillus*'lar tarafından üretilen kitinazlar farklı pH optimum karakteri gösterebilmektedirler. Fakat ağırlıklı karakter bakımından çelişkili bildirimler bulunmaktadır. Örneğin, Ohishi vd. (1996) ve Veda ve Arai (1992)'a göre pek çok kitinazın alkali olduğu bildirilirken, Watanabe vd. (1992) ve Yabuki vd. (1986)'ye göre pek çok kitinazın asidik olduğu bildirilmiştir (Kuzu, 2008). *B. subtilis* TV-125 pH 4.0'de (Senol vd. 2014) ve *Bacillus* sp. pH 5.0'de (Natsir vd., 2002) optimum aktivite gösterirken, *Bacillus* sp. R2 pH 7.5'de (Cheba vd. 2016), *B. circulans* No.4.1 pH 8.0'de (Wiwat vd. 1999), *B. thurungiensis* subsp. HBK51 suşunun ise pH 9.0'da (Kuzu, 2008) optimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Chauhan ve Singh (2013) kitinaz aktivitesi üzerinde pH, sıcaklık ve inkübasyon süresini araştırmışlar, en iyi kitinaz aktivitesinin inkübasyonun başlangıcından itibaren 24. saatte 35 °C'de ve pH 7.0'da, 48. saatte 35 °C'de ve pH 6.0'da, 72. saatte 35 °C'de ve pH 7.0'de, 96. saatte 35 °C'de ve pH 8.0'de, 120. saatte ise 30 °C'de pH 7.0'de, 35 °C'de ve pH 8.0'de gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu, kitinazlarda optimum pH ve sıcaklık değerlerinin kısmen inkübasyon periyoduna bağlı olduğunu göstermektedir.

#### 4.2.2. Enzimlerin Optimum Sıcaklık Değerleri

Enzimlerin aktivite gösterdikleri optimum sıcaklık değerleri her üç izolata ait kitinaz için de 40 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). DBK1 kitinazı 30 °C’de %36 aktivite gösterirken, 50 ve 60 °C’lerde sırasıyla %82 ve 71 aktivite göstermiştir. Relatif aktivitesi 70 °C’de ise %31’e düşmüştür. DBK2 kitinazı 30 °C’de %69 aktivite gösterirken, 50 ve 60 °C’lerde sırasıyla %89 ve 83 oransal aktivite göstermiştir. İzolatın 70 °C’deki aktivitesi %57’ye düşmüştür. DBK3 kitinazı ise 87 °C’de %87 oransal aktivite gösterirken, 50, 60 ve 70 °C’lerde sırasıyla %79, 69 ve 58 oranında aktivite göstermiştir. Her üç izolat da 100 °C’de aktivitelerinin tamamını kaybetmişlerdir (Şekil 4.2).



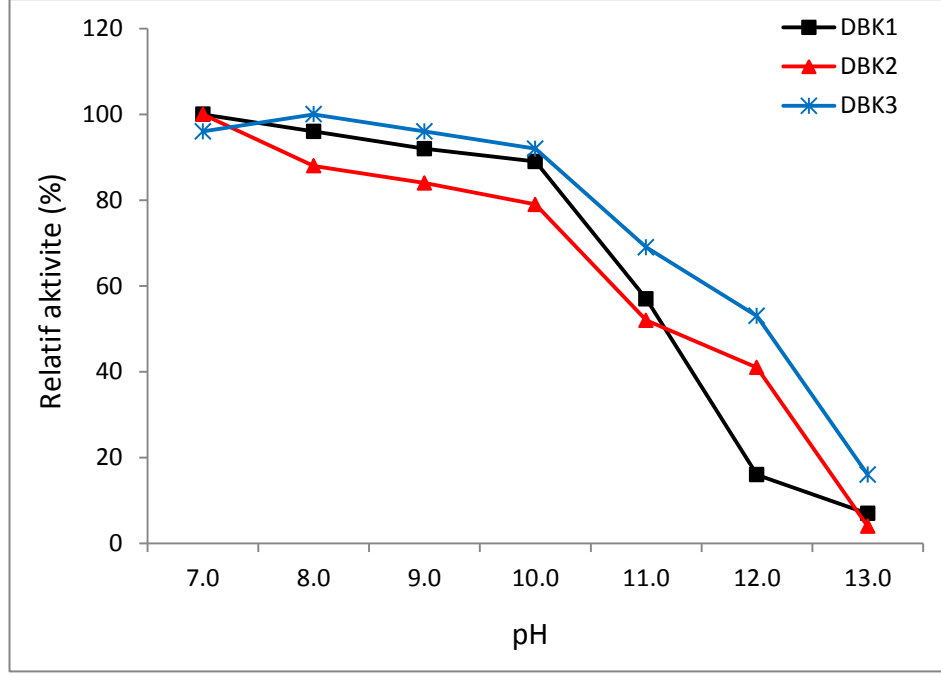
Şekil 4.3. *Bacillus* sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait sıcaklık optimumu grafiği

Her üç enzim de genel olarak, farklı sıcaklık değerlerinde gösterdikleri aktiviteler bakımından benzer karakteristik özellikler sergilemişlerdir. 30-90 °C arasında ortalama relatif aktiviteleri DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazları için sırasıyla %48.9, 66.9 ve 61.9’dur. 50-90 °C sıcaklıklar arasında ortalama relatif aktivite değerleri ise yine aynı sırayla %41.2, 59.8 ve 49.2’dir. Bu veriler her üç enzimin de mezofil karakter göstermesine karşılık, DBK2 kitinazının DBK1 ve DBK3 kitinazlarına göre kısmen daha termostabil olduğunu göstermektedir.

Wiwat vd. (1999) izole ettikleri *Bacillus circulans* No.4.1 suşunun optimum sıcaklık değerini 40 °C, Natsir vd. (2002) *Bacillus* sp.'ye ait kitinaz enziminin optimum sıcaklık değerini 37 °C, Cheba vd. (2016) *Bacillus* sp. R2 kitinazına ait benzer bir optimum sıcaklık değeri 40 °C, Basha ve Ulaganathan (2014) ise *B. subtilis* BC121 suşunun optimum sıcaklık değerini 35 °C olarak bildirmişlerdir. Bu tez çalışması kapsamında izole edilen her üç izolatanın da kitinaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri bu araştırmacılar tarafından izole edilen bakterilere ait kitinazların optimum sıcaklık değeri ile benzerlik göstermekle birlikte, farklı araştırmacılar çalıştıkları *Bacillus* kitinazlarına ait farklı optimum sıcaklık değerleri de rapor etmişlerdir. Kuzu (2008), *Bacillus thuringiensis* subsp. HBK51 suşuna ait kitinaz enziminin optimum sıcaklık değerini 110 °C, 30-120 °C değerleri arasındaki ortalama aktiviteyi ise %83.6 olarak bildirmiştir. Lee vd. (2007) *Bacillus* sp. DAU101 suşuna ait kitinaz enziminin optimum sıcaklık değerini 60 °C, Senol vd. (2014) ise *B. subtilis* TV-125 bakterisine ait kitinazın optimum sıcaklık değerini 50 °C olarak bildirmişlerdir. Brushan ve Hoondal (1999) genel olarak *Bacillus* kitinazlarının 45-55 °C'ler arasında optimum aktiviteye sahip olduklarını açıklamışlardır.

#### **4.2.3. Enzimlerin pH Stabiliteleri**

Enzimlerin farklı pH ortamlarında gösterdikleri stabiliteleri araştırılmış, her üç enzimin de 7.0 ile 10.0 pH değerlerinde oldukça kararlı oldukları ve aktivitelerini büyük ölçüde korudukları gözlenmiştir (Şekil 4.4). DBK1 kitinazı pH 12.0'de ön inkübasyon sonucunda aktivitesinin %84'ünü kaybederken, bu pH değerlerinde DBK2 ve DBK3 kitinazları hemen hemen aktivitelerinin yarısını korumuşlardır. pH 13.0'de ön inkübasyon sonucunda DKB1, DKB2 ve DKB3 enzimleri relatif aktivitelerini sırasıyla %93, 96 ve 84 oranlarında kaybetmişlerdir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *Bacillus* sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait pH stabilite grafiği

DBK1 kitinazı 7.0-12.0 pH aralığında ortalama %75, DBK2 kitinazı %74, DBK3 kitinazı ise %84.3 oranında kalan aktivite göstermişlerdir. Her üç enzim de 9.0-10.0 pH aralığında sırasıyla %90.5, 81.5 ve 94 oranında aktivitelerini korurken, 11.0-12.0 aralığında %36.5, 46.5 ve 61 oranlarında aktivitelerini korumuşlardır. Enzimler en yüksek kararlılıklarını 7.0-10.0 pH aralığında göstermişlerdir. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazları bu pH aralığında sırasıyla %94.25, 87.75 ve 96 oranlarında ortalama kalan aktivite göstermişlerdir. Enzimlerin 7.0 ile 10.0 pH değerleri arasında kararlı olması, bazı endüstriyel kullanımda bir takım avantajlar sağlayabilir.

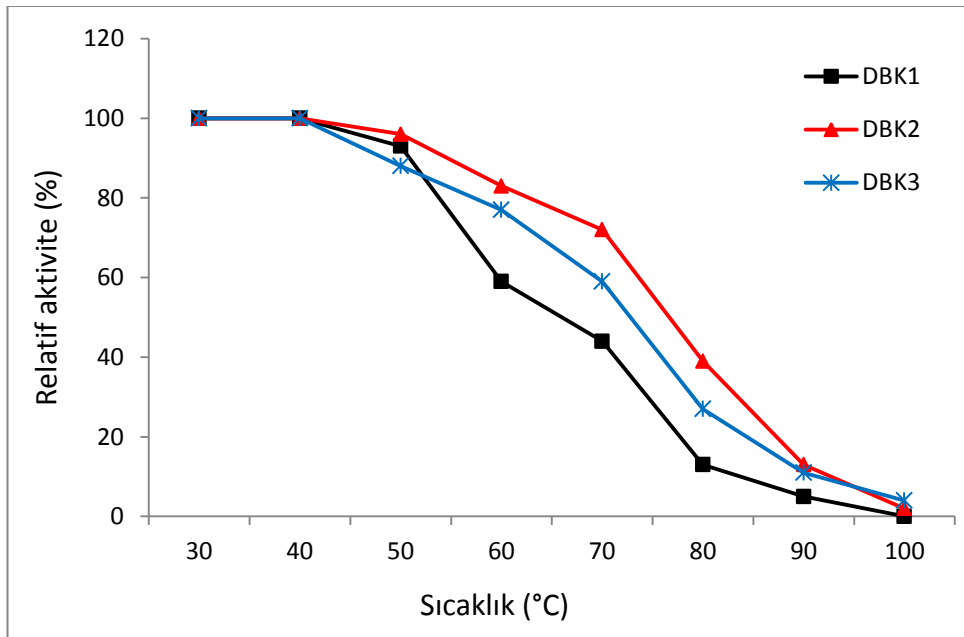
Cheba vd. (2016) izole ettikleri *Bacillus* sp. R2 suşuna ait kitinaz enziminin 7.0 ve 8.0 pH değerlerinde oldukça stabil olduğunu, fakat 6.0 ve 9.0 pH değerlerinde aktivitesini sırasıyla %57 ve 62 oranlarında kaybettiğini bildirmişlerdir. Kuzu (2008) *B. thuringiensis* subsp. HBK51 suşuna ait kitinaz enziminin pH stabilitesinin oldukça yüksek olduğunu, 110 °C'de enzimin 5.0-12.0 pH aralığında ortalama aktivitesini %87, 10.0-12.0 aralığında %97.3, 5.0-8.0 aralığında %75.25, 9.0'da ise %100 oranında koruduğunu bildirmiştir. Bhushan (2000) da benzer şekilde *Bacillus* sp. BG-11 suşuna ait kitinazın 5.0-10.0 pH aralığında kararlı kaldığını bildirmiştir. Bu çalışmada izole edilen DBK1, DBK2 ve DBK3 izolatlarına ait kitinazların pH

stabiliteyi Bhushan (2000) tarafından bildirilen enzimin pH stabilitesi ile benzerlik gösterdiği görülmektedir.

#### 4.2.4. Enzimlerin Sıcaklık Stabiliteyi

İzolatlara ait kitinaz enzimleri 30-100 °C aralığını kapsayacak şekilde, her 10 °C'de 30 dk süreyle ön inkübasyona tabi tutulmuşlar ve sonrasında enzimatik aktivite seviyeleri belirlenmiştir. Her üç izolata ait kitinaz enzimleri 30 ve 40 °C değerlerinde ön inkübasyon sonucunda aktivitelerinin tamamını muhafaza etmişlerdir. Her üç izolata ait enzim de 50 °C'de ön inkübasyon sonucunda sırasıyla %93, 96 ve 88 düzeyinde relatif kalan aktivite göstererek, aktivitelerini büyük ölçüde korumuşlardır. Enzimler 90 ve 100 °C'de ön inkübasyon sonrasında aktivitelerinin önemli bir kısmını kaybetmişlerdir (Şekil 4.5).

DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazları 30 dk ön inkübasyon ile 30-70 °C aralığında ortalama olarak aktivitelerini sırasıyla %79.2, 90.2 ve 84.8 oranında korumuşlardır. 80-100 °C'ler arasında ise ortalama oransal kalan aktivite yine aynı sıra ile %6, 18 ve 14 olarak gerçekleşmiştir. Bu veriler her üç kitinaz enziminin de 30-70 °C'ler arasında stabiliteyi önemli ölçüde koruduklarını göstermektedir.



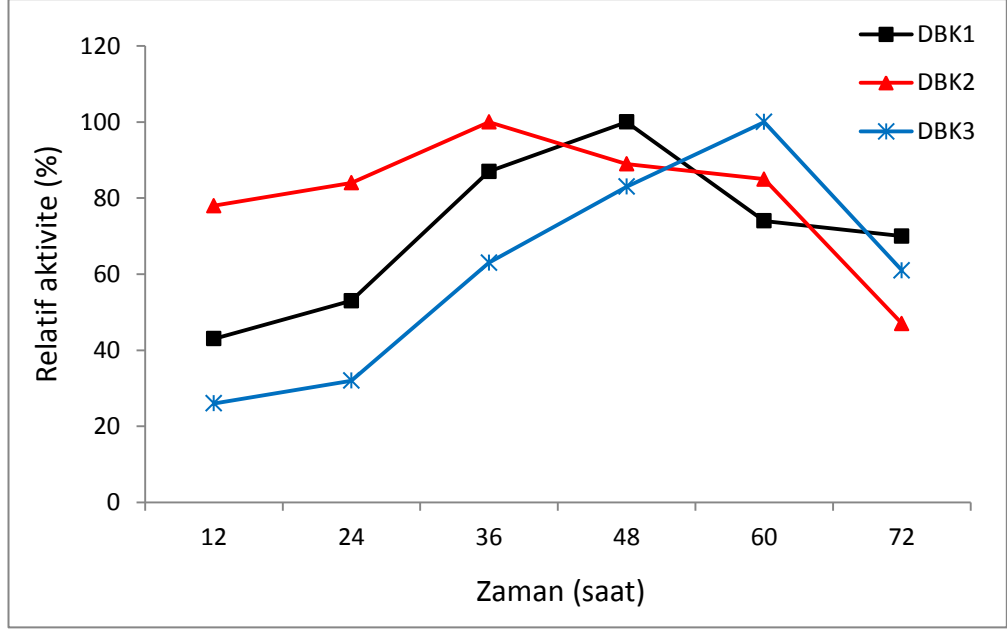
Şekil 4.5. *Bacillus* sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait sıcaklık stabilite grafiği

Khan ve Khan (2014) izole ettikleri *B. circulans* L2 ve *B. licheniformis* 2J-1 suşlarına ait kitinaz enzimlerinin termal stabiliteelerini inkübasyon süresini de dâhil ederek araştırmışlar ve her iki enzimin de 35-45 °C sıcaklık aralığında 120 saat boyunca stabil kaldığını bildirmişlerdir. 30-50 °C sıcaklık aralıklarında DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazları da ortalama %97.7, 98.7 ve 96 oranında aktivite göstererek neredeyse tamamen stabil kalabilmişlerdir. Khan ve Khan (2014) *B. circulans* L2 kitinazının 60-65 °C'de ılımlı, 70 °C'nin üzerinde ise zayıf stabilite gösterdiğini, *B. licheniformis* 2J-1 kitinazının ise 65-70 °C'de ılımlı, 75 °C'nin üzerinde ise zayıf stabilite gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacıların sadece 30 dakika ön inkübasyon süreleri sonucunda elde ettikleri veriler değerlendirmeye alındığında, elde ettikleri bulgular DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazları ile büyük benzerlik göstermektedir. Buna karşılık Kuzu (2008) *B. thurungiensis* subsp. HBK51 suşuna ait kitinaz enziminin 30-120 °C aralığında ortalama %92.4'lük kalan aktivite ile oldukça stabil kaldığını, 90 °C'de aktivitesinin tamamını koruduğunu, 100-110 °C aralığında ise %96 kalan aktivite gösterdiğini bildirmiştir. *B. thurungiensis* subsp. HBK51 suşuna ait kitinaz enziminin optimum sıcaklık değerinin 110 °C olduğu göz önünde bulundurulduğunda, yüksek sıcaklık değerlerinde yüksek stabilite göstermesi normal karşılanmalıdır.

#### **4.2.5. Zamana Göre Enzim Aktiviteleri**

Bakterilerin LB-sıvı besi ortamına inokülasyonlarından itibaren her 12 saatte bir olmak üzere enzim numuneleri alınmış ve 72 saatlik periyotlar için enzim aktivite düzeyleri belirlenmiştir. Analizler sonucunda inokülasyondan itibaren olmak üzere, DBK1 48., DBK2 36. ve DBK3 60. saatte ün yüksek aktivite seviyelerine ulaşmışlardır (Şekil 4.6).

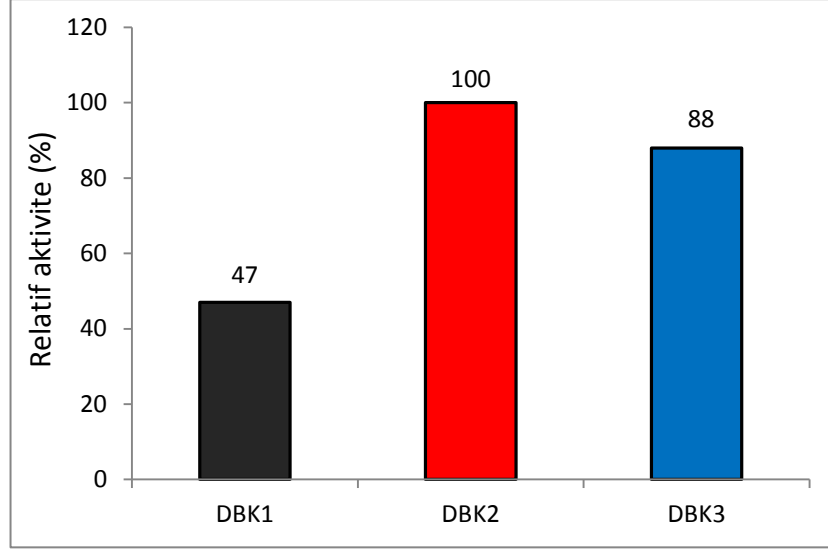




Şekil 4.6. *Bacillus* sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait aktivite/zaman grafiği

#### 4.2.6. Enzimlerin Oransal ve Spesifik Aktiviteleri

Her üç izolata ait enzim aynı anda substrat ile reaksiyona sokularak, enzimlerin kendi içlerinde gösterdikleri aktivite seviyeleri birbirleri ile karşılaştırılmışlardır. Analiz sonucunda en yüksek aktiviteye sahip olan DBK2 enzimine ait aktivite seviyesi %100 olarak kabul edilmiş, diğer iki izolata ait enzimler bu seviye üzerinden orantılanmıştır. Sonuçta, DBK1 ve DBK3 kitinazları DBK2 kitinazına göre sırasıyla %47 ve %88 oranında aktivite göstermişlerdir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarının oransal aktivite grafiği

DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarının mg protein başına spesifik aktivite değerleri ise sırasıyla 6.61, 13.17 ve 8.65 U/mg protein olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). DBK2 kitinazının spesifik aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş, buna göre DBK1 ve DBK3 kitinazlarının oransal spesifik aktivite değerleri ise sırasıyla %55.2 ve 65.7 olarak hesaplanmıştır. Asril vd. (2014) *B. thurungiensis* SAHA 12.08 suşunun kitinaz enziminin spesifik aktivitesini 7.896 U/mg protein, Senol vd. (2014), *B. subtilis* TV-125 kitinazının spesifik aktivitesini 197.14 U/mg, Pandya ve Saraf (2015), ise *B. safensis* kitinazının spesifik aktivitesini 0.19 U/mg olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmalardan farklı *Bacillus* suşlarının ekstrem uçlarda spesifik aktivite gösterebileceği anlaşılmaktadır. Buna göre DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazları olağan düzeylerde spesifik aktivite değerleri göstermişlerdir.

Çizelge 4.1. *Bacillus* sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarına ait spesifik aktivite değerleri

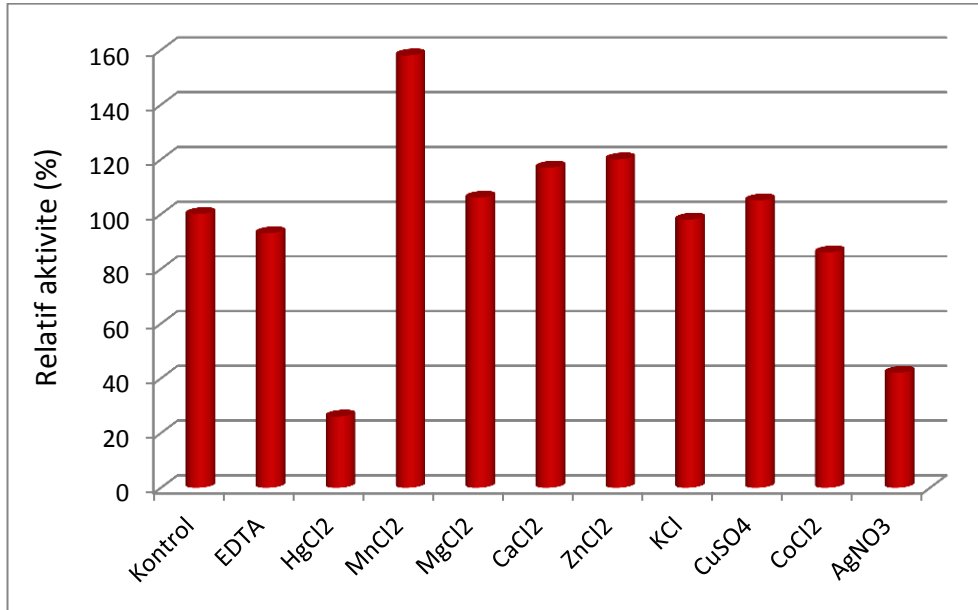
İzolat	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Spesifik aktivite (%)
<i>Bacillus</i> sp. DBK1	6.61	55.2
<i>Bacillus</i> sp. DBK2	13.17	100
<i>Bacillus</i> sp. DBK3	8.65	65.7

#### 4.2.7. Bazı Kimyasalların Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi

EDTA, HgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, KCl, CuSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub> ve AgNO<sub>3</sub> son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde enzim örneklerine ilave edilerek enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hiçbir kimyasalın ilave edilmediği kontrol grubunun aktivitesi %100 kabul edilerek metal iyonlarının etkisi sonucu ortaya çıkan aktivite düzeyleri bu değer ile karşılaştırılmıştır.

##### 4.2.7.1. Kimyasalların DBK1 Kitinazı Üzerine Etkisi

MnCl<sub>2</sub> %158'lik değer ile DBK1 enzim aktivitesi üzerinde en güçlü aktivatör özelliği göstermiştir. ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> ve CuSO<sub>4</sub> sırasıyla %120, 117, 106 ve 105'lik aktivite değerleri ile DBK1 kitinazı üzerinde aktivatör etkisi göstermişlerdir. HgCl<sub>2</sub> ve AgNO<sub>3</sub> ise enzim aktivitesi üzerinde sırasıyla %74 ve %58'lik aktivite kaybı ile DBK1 kitinazı üzerinde en güçlü inhibitörler olmuştur (Şekil 4.8).

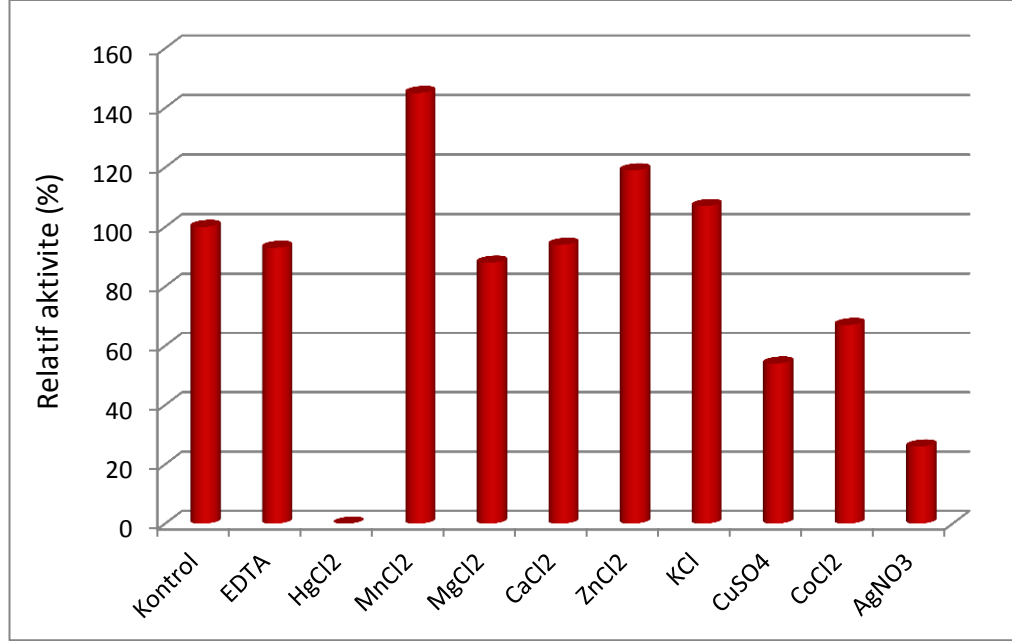


Şekil 4.8. Bazı kimyasalların DBK1 kitinazı üzerine etkisi

##### 4.2.7.2. Kimyasalların DBK2 Kitinazı Üzerine Etkisi

MnCl<sub>2</sub> %145'lik değer ile DBK2 enzim aktivitesi üzerinde en güçlü aktivatör özelliği göstermiştir. ZnCl<sub>2</sub> ve KCl sırasıyla %119 ve 107'lik aktivite değerleri ile DBK2

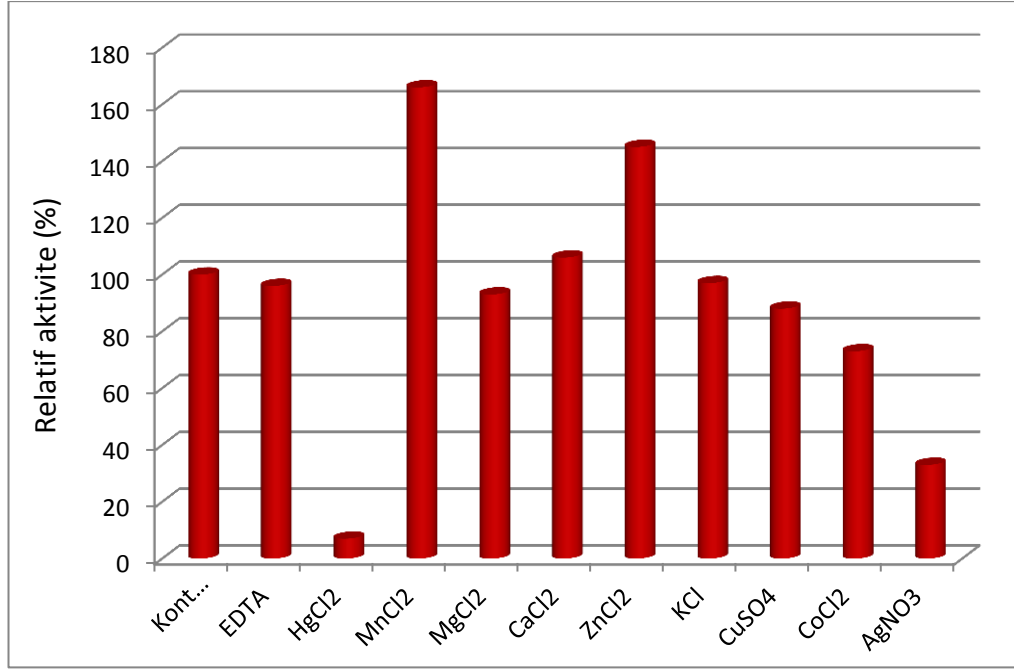
kitinazı üzerinde aktivatör etkisi göstermişlerdir.  $\text{HgCl}_2$  enzim aktivitesini tamamen inhibe ederken,  $\text{AgNO}_3$  ise enzim aktivitesi üzerinde %74'lük bir aktivite kaybına sebep olmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Bazı kimyasalların DBK2 kitinazı üzerine etkisi

#### 4.2.7.3. Kimyasalların DBK3 Kitinazı Üzerine Etkisi

$\text{MnCl}_2$  %166'lık değer ile DBK3 kitinazının aktivitesi üzerinde en güçlü aktivatör özelliği göstermiştir.  $\text{ZnCl}_2$  ve  $\text{CaCl}_2$  sırasıyla %145 ve 106'lık aktivite değerleri ile DBK3 kitinazı üzerinde aktivatör etkisi göstermişlerdir.  $\text{HgCl}_2$  enzim aktivitesinde %93'lük bir inhibisyona sebep olurken,  $\text{AgNO}_3$  %67'lik bir inhibisyona sebep olmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Bazı kimyasalların DBK3 kitinazı üzerine etkisi

Cheba vd. (2016) metal iyonların, kimyasal ajanların ve organik çözücülerin *Bacillus* sp. R2 suşuna ait kitinaz enzimi üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar,  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$ , un enzim aktivitesini stimüle ederken,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ag^+$  ve  $Hg^{2+}$ , nın inhibe ettiğini,  $\beta$ -merkaptioethanol ve EDTA'nın ise kısmi aktivite kaybına neden olurken, %1 SDS'in tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Kuzu vd. (2012), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 suşu tarafından üretilen kitinaz üzerinde 1-5 mM konsantrasyonlarında  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $K^+$  ve  $Cu^{2+}$ , nin aktivatör etki gösterdiğini, EDTA, SDS,  $HgCl_2$  ve etil-asetimidatın kısmi inhibitör etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bhattacharya vd. (2016), *B. pumilus* JUBCH08 kitinazı üzerinde  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  aktivatör etki gösterirken,  $Fe^{3+}$ ,  $Ag^+$  ve  $Hg^{2+}$  kuvvetli inhibisyon etkisi gösterdiğini bildirmişlerdir. Ni vd. (2015), *B. thuringiensis* tarafından üretilen ChiW50A kitinazının  $Cu^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  tarafından inhibe edilirken,  $Mg^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  tarafından aktive edildiğini bildirmişlerdir. Jankiewicz vd. (2016), *B. licheniformis* M3 suşu tarafından üretilen iki adet kitinaz enzimi (Chi1 ve Chi2) üzerinde  $Ca^{2+}$  ve  $Na^+$ , un aktivatör etkisi gösterdiğini,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , nun orta düzeyde inhibisyon,  $Cd^{2+}$  ve  $Hg^{2+}$ , nın ise kuvvetli düzeyde inhibisyon etkisi gösterdiğini bildirmişlerdir. Yine araştırmacılar  $Mg^{2+}$ , un Chi1 kitinazı üzerinde inhibisyon etkisi bulunurken, Chi2 kitinazı üzerinde aktivasyon etkisi bulunduğunu bildirmişlerdir. Khiyami ve Masmali (2008), ise izole ettikleri iki adet *B.*

*licheniformis* suşu (A2 ve A35) tarafından üretilen kitinaz enzimlerinden her ikisinin de  $Ca^{2+}$  tarafından aktive olduğunu,  $Mg^{2+}$ 'un ise sadece A2 kitinazını %50 oranında aktive ettiğini fakat A35 kitinazı üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir.

Metal iyonlarının ve bazı kimyasalların *Bacillus* sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazları üzerine etkisi incelendiğinde,  $MnCl_2$  ve  $ZnCl_2$ 'ün her üç enzimi de aktive ettiği, EDTA ve  $CoCl_2$ 'ün hafif inhibisyon,  $HgCl_2$  ve  $AgNO_3$ 'ün ise kuvvetli inhibisyon etkisi gösterdiği görülmektedir.  $Mn^{2+}$  *Bacillus* sp. R2 ve *B. pumilus* JUBCH08, kitinazlarında çalışıldığı ve her iki enzim üzerinde de aktivatör etki gösterdiği görülmektedir.  $Zn^{2+}$  ise *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 kitinazını aktive ederken, *Bacillus* sp. R2, *B. thuringiensis* ChiW50A ve *B. licheniformis* M3 kitinazlarını belirli seviyelerde inhibe etmiştir.

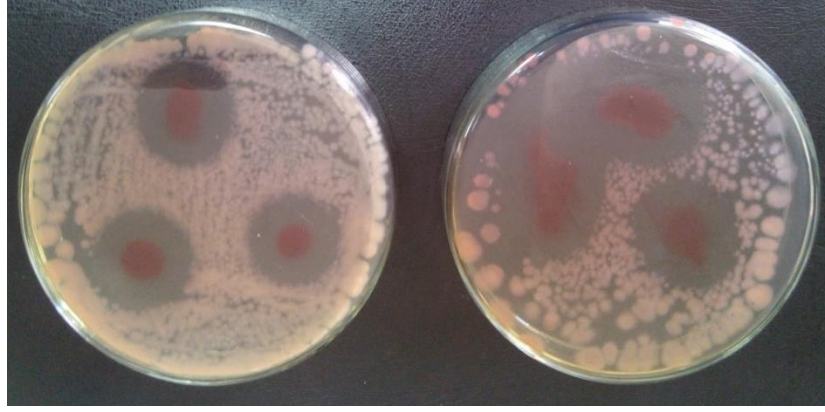
$HgCl_2$  DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarında sırasıyla %74, 100 ve 93 düzeylerinde aktivite kaybına neden olmuştur.  $HgCl_2$ , benzer şekilde *Bacillus* sp. R2, *B. pumilus* JUBCH08 ve *B. licheniformis* M3 kitinazları üzerinde kuvvetli inhibisyon etkisi gösterirken, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 kitinazında kısmi inhibisyon etkisi göstermiştir. Benzer şekilde  $AgNO_3$ , DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazları gibi *Bacillus* sp. R2, *B. pumilus* JUBCH08 ve *B. licheniformis* kitinazlarını da kuvvetli bir şekilde inhibe etmiş, bu metal iyonu diğer kitinazlar üzerinde ise çalışılmamıştır.  $MnCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $HgCl_2$  ve  $AgNO_3$ 'ün kitinaz enzimleri üzerine etkileri incelendiğinde, genel olarak DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazları üzerine olan etkileri ile diğer literatür bildirişlerinde verilen etkileri büyük oranda benzerlik göstermektedir.

Metal iyonlarının ve diğer kimyasal maddelerin enzimler üzerine etkileri genel olarak farklılık arz etmektedir. Örneğin  $CuSO_4$  DBK1 kitinazı üzerinde aktivatör etki gösterirken DBK2 kitinazını yarı yarıya inhibe etmiştir. Benzer şekilde  $CaCl_2$  DBK1 ve DBK3 kitinazını aktive ederken DBK2 kitinazını inhibe etmiştir. Yine  $CuSO_4$  *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 kitinazını aktive ederken *B. thuringiensis* ChiW50A kitinazını inhibe etmiştir. Bu örnekleri farklı diğer çalışmalar ile çoğaltmak mümkündür.

Metal iyonları enzim üzerindeki etkilerini üç şekilde göstermektedir: Birincisi, metal iyonu ile substrat doğru substratı şekillendirmek için kompleks oluşturur. Bu tip davranış daha çok metal-etkinleşmiş enzimlerde gözlenir. İkincisi, metal önce enzime bağlanır ve substratla interaksiyon yakası olarak iş görür. Bu tip davranışta metal iyonu ya substrat bağlanma bölgesi, ya enzimin katalitik bölgesinin bir unsuru, ya da her ikisi olarak fonksiyon gösterir. Üçüncüsü ise, metal iyonunun enzimin aktif bölgesinden uzak bir bölgeye bağlanmasıdır. Bu durumda, metal proteinin yapısını korumak için hizmet edebilir ve sadece katalitik aktiviteyi etkileyebilir, ya da proteinin çok veya az aktif yapısını dengeleyerek aktiviteyi düzenleyebilir (Riordan, 1977). Demir, bakır ve molibdene daha çok oksidoredüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerde rastlanır. Çoğunlukla metal iyonu elektron transfer işlemine katılır ve oksidasyon safhasında periyodik değişikliklere uğrar. Metal iyonları ile enzim ve substrat arasındaki bu karmaşık ilişkiler ve etkileşimler enzimin substrat üzerindeki etkisinin artması veya azalması ile neticelenir. Farklı suşlar tarafından üretilen aynı enzimler farklı sekans dizilimine sahip olacağından ve dolayısıyla buna bağlı olarak farklı üç boyutlu yapı göstereceğinden, aynı metal iyonu tarafından farklı şekilde etkilenmeleri olasılık dâhilindedir.

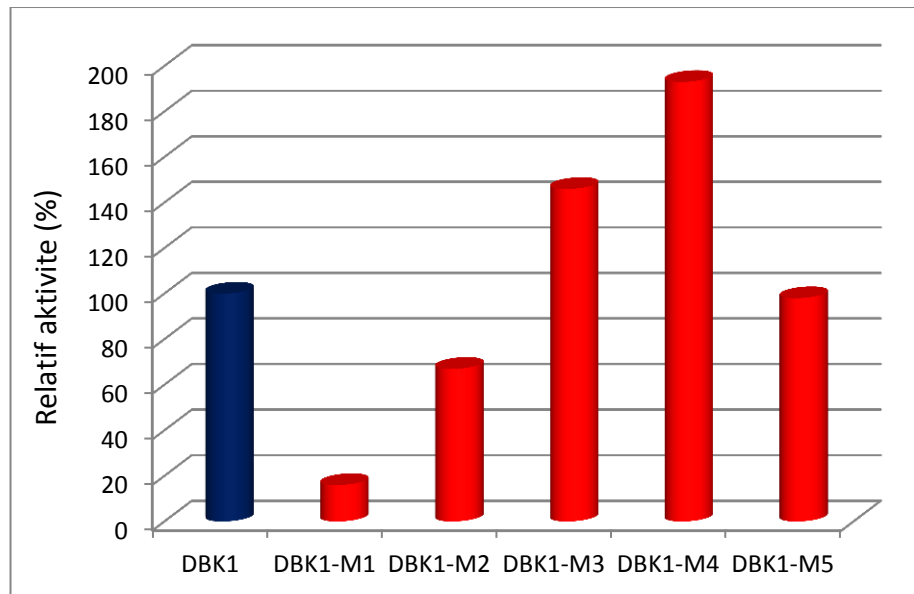
#### **4.2.7.4. Mutant Varyantlara Ait Kitinaz Aktivite Düzeyleri**

*Bacillus* sp. DBK1, DBK2 ve DBK3 izolatları EtBr ile muamele edilmişlerdir. Mutasyon plaklarında EtBr damlatılan bölgelerde koloni gelişiminin gözlenmediği (ölüm zonu), EtBr etkisinin zayıfladığı kıyı bölgelerden itibaren ise koloni gelişiminin başladığı görülmüştür (Şekil 4.11). EtBr'ün yayıldığı alanın kıyı kesimlerinden EtBr ile temas etmiş fakat ölmemiş olan koloniler toplanarak 1 adet yabani varyant kolonisi ile birlikte (kontrol) kolloidal kitin içeren LB-agar plaklarına aktarılmıştır. Uygun koşullarda inkübasyon sonucunda aktivite zonu büyüklükleri dikkate alınarak her bir izolata ait kontrol kolonisine ait zon baz alınarak birer adet küçük, dörder adet ise büyük zona sahip olmak üzere toplam beşer adet mutant varyant belirlenmiştir. Mutant varyantların enzim üretim düzeyleri belirlenerek yabani tip izolatların enzim üretim düzeyleri ile relatif olarak karşılaştırılmışlardır.



Şekil 4.11. EtBr muamelesi sonucunda koloni gelişimi tamamlanan plakların görüntüsü

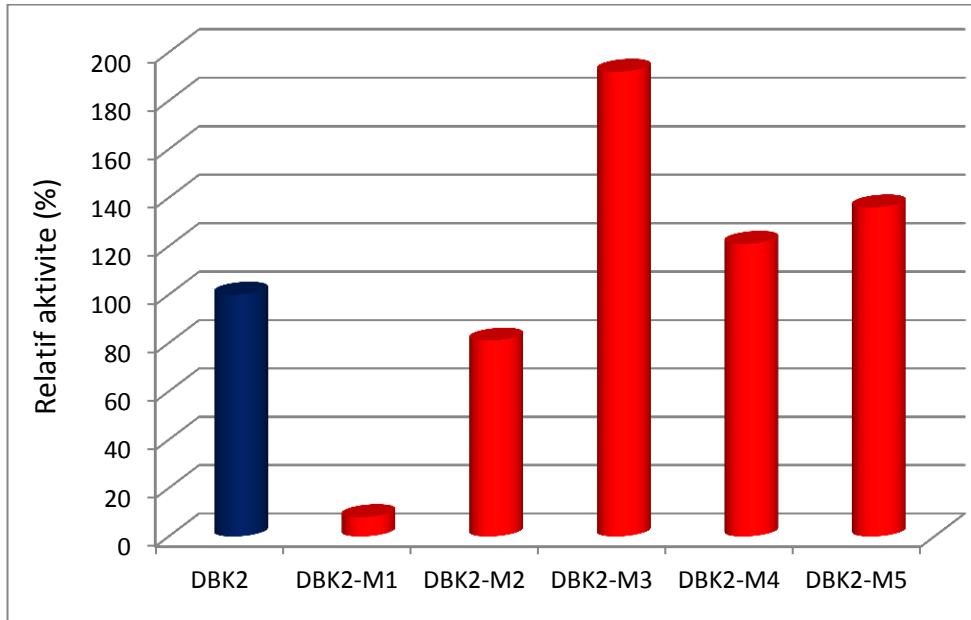
*Bacillus* sp. DBK1 izolatından elde edilen mutant varyantlar sırasıyla DBK1-M1, DBK1-M2, DBK1-M3, DBK1-M4 ve DBK1-M5 olarak isimlendirilmişlerdir. Küçük aktivite zonu veren DBK1-M1 mutant varyantı yabani varyanta göre sadece %16 oranında aktivite gösterebilmiştir. Buna karşılık DBK1-M2 ve DBK1-M5 varyantları da enzim üretim düzeyleri bakımından yabani varyantın enzim üretim düzeyinin gerisinde kalmış ve sırasıyla %67 ve 98 oranında aktivite göstermişlerdir. EtBr ile muamele DBK1-M3 ve DBK1-M4 mutant varyantlarda enzim üretim düzeylerini artırmış ve bu mutant varyantlar sırasıyla %146 ve 193 oranlarında enzim aktivitesi göstermişlerdir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *Bacillus* sp. DBK1 ile mutant varyantlarının enzim üretim düzeylerinin oransal karşılaştırma grafiği



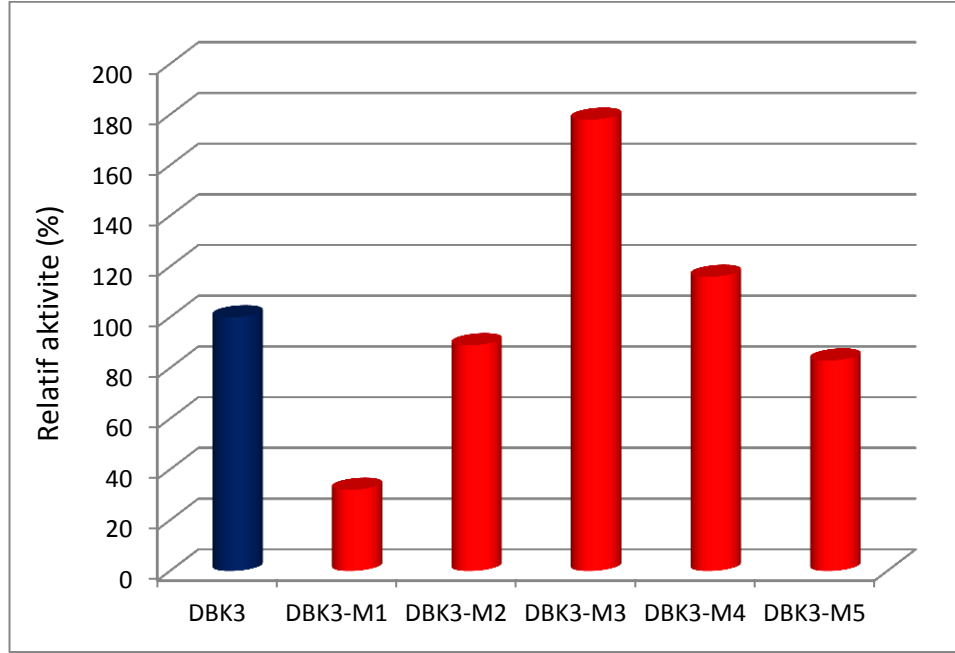
*Bacillus* sp. DBK2 izolatından elde edilen mutant varyantlar sırasıyla DBK2-M1, DBK2-M2, DBK2-M3, DBK2-M4 ve DBK2-M5 olarak isimlendirilmişlerdir. Küçük aktivite zonu veren DBK2-M1 mutant varyantı yabancı varyanta göre sadece %8 oranında aktivite gösterebilmiştir. Buna karşılık DBK2-M2 varyantı da enzim üretim düzeyleri bakımından yabancı varyantın enzim üretim düzeyinin gerisinde kalmış ve %81 oranında aktivite göstermiştir. EtBr ile muamele DBK2-M3, DBK2-M4 ve DBK2-M5 mutant varyantlarda enzim üretim düzeylerini artırmış ve bu mutant varyantlar sırasıyla %191, 121 ve 136 oranlarında enzim aktivitesi göstermişlerdir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *Bacillus* sp. DBK2 ile mutant varyantlarının enzim üretim düzeylerinin oransal karşılaştırma grafiği

*Bacillus* sp. DBK3 izolatından elde edilen mutant varyantlar sırasıyla DBK3-M1, DBK3-M2, DBK3-M3, DBK3-M4 ve DBK3-M5 olarak isimlendirilmişlerdir. Küçük aktivite zonu veren DBK1-M1 mutant varyantı yabancı varyanta göre %32 oranında aktivite gösterebilmiştir. Buna karşılık DBK3-M2 ve DBK3-M5 varyantları da enzim üretim düzeyleri bakımından yabancı varyantın enzim üretim düzeyinin gerisinde kalmış ve sırasıyla %89 ve 83 oranında aktivite göstermişlerdir. EtBr ile muamele DBK3-M3 ve DBK3-M4 mutant varyantlar da enzim üretim düzeylerini arttırmış ve

bu mutant varyantlar sırasıyla %178 ve 116 oranlarında enzim aktivitesi göstermişlerdir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *Bacillus* sp. DBK3 ile mutant varyantlarının enzim üretim düzeylerinin oransal karşılaştırma grafiği

Mutasyon in-vitro çalışmalarda özellikle mikrobiyal enzim üretiminin artırılması veya genin susturularak enzim üretiminin tamamen bloke edilmesi amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Özellikle endüstriyel kullanım potansiyeline sahip bir mikroorganizmayı mutajenlerle muamele ederek herhangi bir enzim üretimini bloke etmek, aynı mikroorganizmaya başka bir ekstremofilden aynı geni aktararak daha ekonomik ve saf olarak üretilmesine olanak sağlamaktadır. Örneğin Özcan (1996a) mezofilik bir bakteri olan *Bacillus subtilis* ORBA (1) suşunda  $\alpha$ -amilaz genini EtBr ile körelterek bu bakteriyi önce  $\alpha$ -amilaz negatif (-) haline dönüştürmüş, sonrasında aynı bakteriye bu sefer termofil *Bacillus stearothermophilus* bakterisine ait sıcaklığa dirençli  $\alpha$ -amilaz genini aktararak mezofilik suşta termostabil  $\alpha$ -amilaz enzimini ürettirmiştir (Özcan, 1996b). Mutasyon ile muamele genellikle genlerin susturulması ile neticelenmektedir. Fakat bazı durumlarda genin olağan durumun üzerinde transkribe edilmesi ve neticede enzimin daha fazla üretilmesi ile sonuçlanabilmektedir. Bu, muhtemelen gen üzerinde negatif baskı oluşturan kontrol genlerinin mutasyon neticesinde körelmesi ve böylece hedef gen üzerindeki baskının kalkarak normalden daha yüksek düzeyde transkribe olması ile açıklanabilir. Bu

yöntemle Kole ve Altosaar (1985) ve Vaidya vd., (2003) kitinaz, Sidhu vd., (1997) amilaz, O'sullivan (2000)  $\beta$ -galaktosidaz, Reddi Pradeep vd., (2012) selüloz, Raju vd., (2012) glukoamilaz, Aziz vd., (2011) ksilanaz, Yamashiro vd., (2010)  $\beta$ -amylase ve Haq vd., (2010)  $\alpha$ -amilaz üretimini arttırmayı başarmışlardır. Bu çalışmada da benzer olarak üç adet yabancı varyantın mutasyonu neticesinde toplam 7 adet enzim aktivitesi artırılmış mutant varyant elde edilmiştir.

#### 4.2.7.5. Mutant Varyantlara Ait Spesifik Enzim Aktivite Düzeyleri

Yabancı tip izolatlar ile bu izolatlardan EtBr uygulaması ile elde edilen mutant varyantların spesifik aktivite düzeyleri U/mg protein ve % olarak Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Yabancı tip izolatlar ile mutant varyantların spesifik aktivite düzeyleri

İzolat	Enzim üretici varyete (yabancı ve mutantları)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Spesifik aktivite (%)
<i>Bacillus</i> sp. DBK1	DBK1	6,61	100
	DBK1-M1	0,67	10.1
	DBK1-M2	4,14	62.6
	DBK1-M3	6,98	105.6
	DBK1-M4	10,23	154.77
	DBK1-M5	6,88	104.1
<i>Bacillus</i> sp. DBK2	DBK2	13,17	100
	DBK2-M1	0,21	1.6
	DBK2-M2	8,44	64.1
	DBK2-M3	19,76	150.0
	DBK2-M4	15,47	117.5
	DBK2-M5	14,5	110.1
<i>Bacillus</i> sp. DBK3	DBK3	8,65	100
	DBK3-M1	2,13	24.6
	DBK3-M2	5,07	58.6
	DBK3-M3	11,35	131.2
	DBK3-M4	9,03	104.4
	DBK3-M5	6,65	76.9

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Çalışmanın sonuçları aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Bu çalışma ile kitinaz aktivitesine sahip 3 adet *Bacillus* sp. (*Bacillus* sp. DBK1, *Bacillus* sp. DBK2, *Bacillus* sp. DBK3) izolasyonu yapılmıştır.
2. İzolatlar tarafından üretilen enzimlerin kısmi karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.
3. Enzimlerin optimum sıcaklık değerleri her üç kitinaz için de 40 °C olarak belirlenmiştir.
4. Enzimlerin pH optimumları DBK1 kitinazı için 7.0 olarak belirlenirken, DBK2 ve DBK3 kitinazları için 6.0 olarak belirlenmiştir.
5. Bakterilerin inokülasyonundan itibaren en yüksek düzeyde enzim üretimi DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazları için sırasıyla 48., 36. ve 60. saatlerde gerçekleşmiştir.
6. Her üç enzim de 10.0 pH değerlerine kadar stabilitelerini büyük oranda korurken, daha yüksek alkali değerlere doğru stabilitelerinde hızlı bir düşüş gözlenmiştir.
7.  $MnCl_2$  ve  $ZnCl_2$  her üç enzim için de ortak aktivatör olurken, EDTA,  $HgCl_2$ ,  $CoCl_2$  ve  $AgNO_3$  ortak inhibitör olmuştur. En güçlü inhibitör olarak belirlenen  $HgCl_2$  DBK2 kitinazının aktivitesini tamamen ortadan kaldırmış, DBK3 ve DBK1 kitinazlarında ise sırasıyla %93 ve 74 oranlarında aktivite kayıplarına sebep olmuştur.
8. DBK1, DBK2 ve DBK3 kitinazlarının spesifik aktiviteleri sırasıyla 6.61, 13.17 ve 8.65 U/mg protein olarak belirlenmiştir.

9. Her üç izolat da kuvvetli bir mutajen olan EtBr ile muamele edilerek enzim üretimi artırılmış mutant varyantlar da elde edilmiştir. DBK1 yabani varyantından elde edilen DBK1-M4, DBK2 yabani varyantından elde edilen DBK2-M3 ve DBK3 yabani varyantından elde edilen DBK3-M3 mutant varyantları, kendi yabani varyantlarına göre en yüksek düzeyde aktivite gösteren mutant varyantlar olarak belirlenmiştir.

## 5.2. Öneriler

Çalışma sonucunda öngörülen öneriler aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Kitinaz enzimi doğada deniz ürünleri işleyen işletmelerin atıklarının dekompozisyonu, kültür bitkilerinin zararlı fungus ve böceklerden korunması gibi hali hazırda önemli faaliyetlerde kullanılmaktadır. Diğer taraftan değerli bir hayvan yemi olan silajın mantar ve funguslarca bozulmasının önlenmesi ve bu vesile ile ekonomik kayıpların önüne geçilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Bunun için kitinaz genlerinin silaj bakterilerinde klonlanması da dâhil olmak üzere ilave araştırmalar yapılması ile daha büyük ekonomik kazanımlar elde edilebilecektir.
2. Yabani izolatlar üzerinde farklı mutajenler de kullanılarak mutasyon çalışmalarına devam edilmeli ve daha yüksek enzim aktivitelerine sahip mutant varyantların elde edilmesi amaçlanmalıdır.
3. Enzimlerin kitin içeren biyolojik materyaller (böcek, fungus, nematod vs.) üzerindeki etkileri araştırılarak en çok hangi alanda daha efektif bir şekilde kullanılabileceği belirlenmelidir.
4. Genler farklı bakterilerde klonlanarak daha bol, daha saf ve daha ucuz bir şekilde üretimleri hedeflenmelidir.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Aziz, M.S., Talkhan, F.N., Fadel, M., AbouZied, A.A., Abdel-Razik, A.S., 2011. Improvement of xylanase production from *Streptomyces pseudogriseolus* via UV mutagenesis. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(5): 1045-1050.
- Abeles, F.B., Bosshart, R.P., Forrence, L.E., Habig, W.H., 1971. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. Plant Physiology 47(1), 129-134.
- Alikhanian, S.I., 1962. Induced mutagenesis in the selection of microorganisms. Advances in Applied Microbiology, 4: 1-50.
- Allans, C., Atman, L.C., Bessinger, R.E., Gosh, D.K., Neogi, S. 1984. Biomedical applications of chitin and chitosan. In chitin, chitosan and related enzymes. Ed. J.P.Zikakis, Academic Pres. Inc., Orlando, Sandiego, Newyork, p:19, ISBN:0-12-780950-3.
- Asril, M., Mubarik, N.R., Wahyudi, A.T., 2014. Partial purification of bacterial chitinase as biocontrol of leaf blight disease on oil palm. Research Journal of Microbiology, 9(6): 265-277.
- Basha, S., Ulaganathan, K., Identification of a broad-spectrum antifungal chitinase from *Bacillus subtilis* strain BC121. Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology, 3(2): 1-9, 2014.
- Bell, A.A., 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. Annual Reviews of Plant Physiology, 32: 21-81.
- Berger, H., Bammar, W.J., Yanofsky, C., 1966. Spontaneous and ICR191-A-induced framshifts in the A gene of *E.coli* tryptophan synthetase. Journal of Bacteriology, 96(5): 1672-1679.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A., Gupta, R.K., 2007. Bacterial chitinases: Poperties and potential, Critical Reviews in Biotechnology, 27: 21-28.
- Bhattacharya, S., Das, A., Samadder, S., Rajan, S.A., 2016. Biosynthesis and characterization of a thermostable, alkali-tolerant chitinase from *Bacillus pumilus* JUBCH08 displaying antagonism against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. 3 Biotech, 6(1): 87.

- Bhushan, B., 2000. Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5): 453-459.
- Bhushan, B., Hoondal, G.S., 1999. Effect of fungicides, insecticides and allosamidin on a thermostable chitinase from *Bacillus* sp. BG-11, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 403-404.
- Bilgilişoy, M. 2003. Construction of *Bacillus subtilis* strains producing various enzymes by mutagenesis. Ç. Ü. F. Z . Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Boller, T., 1985. In *Cellular and molecular biology of plant stress*, pp. 247-262. Edited by J. L. Key & T. Kosuge, New York: Alan R. Liss, Inc.
- Brown, D.F., 1966. X-ray-induced mutation in extracellular phages. *Nature*, 212:1595.
- Brown, L.R., Brown-Skrobot, S.K., Ladner, C.M., 1982. Biological treated shrimp waste as a seed treatment control of pathogenic fungi. In *Developments in Industrial Microbiology, Proceedings of the 38<sup>th</sup>. General Meeting of the Society of the for Industrial Microbiology*. 23: 513-519.
- Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G., 1996. Comparative studies of chitinase A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 142(Pt 7): 1581-1589.
- Chanpen, W., Patcharapon, S., Amarat, B., 1999. Purification and characterisation of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1. *Current Microbiology*, 39: 134-140.
- Chauhan, M., Singh, P., 2013. Production, optimization and characterization of chitinase enzyme by *Bacillus subtilis*. *Agriways*, 1(1): 5-11.
- Cheba, B.A., Zaghloul, T.I., EL-Mahdy, A.R., EL-Massry, M.H., 2016. Effect of pH and temperature on *Bacillus* sp. R2 chitinase activity and stability. *Procedia Technology*, 22: 471-477.
- Chen, J., Weng, H., 1983. The performance of immobilized glucose-isomerase supported by shrimp chitin in various types of reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 725-733.
- Crick, F.H.C., Barnett, L., Brenner, S., Watts-Tobin, R.J., 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192: 1227.
- Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R., Hoondal, G.S., 2005. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(2): 134-145, 2005.

- Dempsey, D.A., Silva, H., Klessig, D.F., 1998. Engineering disease and pest resistance in plants. *Trends Microbiology*, 54: 54-61.
- Donderski, W., Brzezinska, M.S., 2005. The influence of heavy metals on the activity of chitinases produced by planktonic, benthic and epiphytic bacteria. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14: 851–859.
- Dubourdieu, D., Desplanques, C., Villettaz, J.C., Ribereau-Gayon, P., 1985. Investigations of an industrial  $\beta$ -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carbohydrate Research*, 144(2): 277-287.
- FLACH, J., PLET, P.E., JOLLES, P. 1992. What's the new in chitinase research? *Experientia*, 48: 701-716.
- Fleuri L.F., Kawaguti H.Y., Sato H.H., 2009. Production, purification and application of extracellular chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(3): 623-630.
- Glazer, A., Nikaido, H., 1995. *Microbial Biotechnology, Fundamentals of Applied Microbiology*. W.H. Freeman and Company, USA.
- Godfrey, T., West, S., 1996. *Introduction to Industrial Enzymology. Industrial Enzymology (Second Edition)*. Ed. by T. Godfrey and S. West. Stockton Press, New York.
- Gooday, B.W. 1977. Biosynthesis of the fungal cell wall-mechanisms and implications. *Journal of General Microbiology*, 99(1): 1-11.
- Gümüşel, F., 2002. *Biyoteknoloji, genetik ve saglik sektörü. Kocaeli Sanayii için teknolojik uzgörü ortak projesi. s. 73-135.*
- Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abdin, M.Z., Musarrat, J., Javed, S., 2013. Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5(1): 21-29.
- Han, K.I., Patnaik, B.B., Kim, Y.H., Kwon, H.J., Han, Y.S., Han, M.D., 2014. Isolation and characterization of chitinase-producing *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from salted and fermented shrimp, *Acetes japonicus*. *Journal of Food Science*, 79(4): M665-M674.
- Haq, I., Ali, S., Javed, M.M., Hameed, U., Saleem, A., Adnan, F., Qadeer, M.A., 2010. Production of alpha amylase from a randomly induced mutant strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application as a desizer in textile industry. *Pakistan Journal of Botany*, 42(1): 473-480.



- Harwood, C.R., *Bacillus subtilis* and Its Relatives: Molecular Biological and Industrial Workhorses. Elsevier Science Publishers Ltd. (U.K.), 10: 247-256, 1992.
- Hopwood, D.A., 1970. Isolation of mutants. *Methods in Microbiology*, vol. 3A, p. 3363, Academic Press, New York.
- Huang, J.H., Chen, C.J., Su, Y.C., 1996. Production of chitinolytic enzymes from a novel species of *Aeromonas*. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(2): 89-95.
- Ibrahim, S.A., O'sullivan, D.J., 2000. Use of chemical mutagenesis for the isolation of food grade beta-galactosidase overproducing mutants of bifidobacteria, lactobacilli and *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 83(5): 923-930.
- Ifuku, S., 2014. Chitin and chitosan nanofibers: preparation and chemical modifications. *Molecules*, 19: 18367-18380.
- Jankiewicz, U., Kozłowska, M., Swiontek-Brzezinska, M., Nowosielski, J., Stepniewska-Jarosz, S., 2016. The chitinolytic bacterium *Bacillus licheniformis* M3 and its potential application in biological plant protection. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 19(2): 1-5.
- Jeuniaux, C., 1966. Chitinase. *Methods in Enzymology*, 8: 644-650.
- Kavil, S.P., Pallavesam, A., Sumesh, K.M., Bhairappanavar, S.B., Sadashiv, S.O., Unakal, C., Paul, C.R., 2014. Improvement of chitinase production capacity of *Shigella* sp. by random mutation and altering the nutrient component of production media. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*, 3(2): 1717-1726.
- Kawashima, S., Ikehata, H., Tada, C., Ogino, T., Kakizaki, H., Ikeda, M., Fukushima, H., Matsumiya, M., 2016. Stomach chitinase from Japanese Sardine *Sardinops melanostictus*: Purification, characterization, and molecular cloning of chitinase isozymes with a long linker. *Marine Drugs*, 14(1): 22
- Khan, R.S., Khan, Z.H., 2014. Studies on chitinase isolation and thermostability between *Bacillus circulans* strain L2 and *Bacillus licheniformis* 2J-1. *Science Research Reporter*, 4(1): 01-07.
- Khiyami, M., Masmali, I., 2008. Characteristics of thermostable chitinase enzymes of *Bacillus licheniformis* isolated from red palm weevil gut. *Australian Journal Basic and Applied Sciences*, 2(4): 943-948.

- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A., 2012. Concepts of Genetics, 10<sup>th</sup> ed., ISBN: 978-0-321-72412-0.
- Kole, M.M., Altosaar, I., 1985. Increased chitinase production by a non-pigmented mutant of *Serratia marcescens*. FEMS Microbiology Letters, 26(3): 265-269.
- Kotchoni, S.O., Shonukan, O.O., 2002. Regulatory mutations affecting the synthesis of cellulase in *Bacillus pumilus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18(5): 487-491.
- Kuddus, S.M., Ahmad, R.I.Z., 2013. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extra cellular chitinase. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 11(1): 39-46.
- Kuzu, S.B., 2008. Kitinaz üreten *Bacillus* izolasyonu, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana
- Kuzu, S.B., Korkmaz Güvenmez, H., Denizci, A.A., 2012. Production of a thermostable and alkaline chitinase by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HBK-51. Biotechnology Research International, Article ID: 135498, 6 pages.
- Lee Y.S., Park I.H., Yoo J.S., Chung S.Y., Lee Y.C., Cho Y.S., Ahn S.C., Kim C.M. and Choi Y.L. 2007. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101, Bioresource Technology, 98(14): 2734-2741.
- Loni, P.P., Bajekal, S.S., 2011. Alkaline chitinase from *Bacillus firmus* SBPL-05 isolated from alkaline-saline environment of Lonar Lake. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences, 1(3): 161-165.
- Madigan, T.M., Martinko, M.J., Parker, J., 1997. Brock Biology of Microorganisms. International Edition, 8<sup>th</sup> Ed.
- Mathivanan, N., Kabilan, V., Murugesan, K., 1998. Purification, characterization and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. Canadian Journal of Microbiology, 44: 646–651.
- Matsumoto, K.S., 2006. Fungal chitinases. Advances in Agricultural and Food Biotechnology, 289-304.
- Melentiev, A.I., Galimzianova, N.F., Gilvanova, E.A., Shchelchkova, E.A., Kuzmina, L.Y., Boyko, T.F., Usanov, N.G., Aktuganov, G.E., 2014. Characterization of novel alkaliphilic isolate of *Bacillus mannanilyticus*, strain

- IB-OR17, displaying chitinolytic and antifungal activities. *Advances in Microbiology*, 4: 455-464.
- Muzzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C., Gooday, G.W. 1986. Chitin in nature and technology. Pergamon Press, New York, pp: 39-50.
- Natsir, H., Chandra, D., Rukayadi, Y., Suhartono, M.T., Hwang, J.K., Pyun, Y.R., 2002. Biochemical characteristics of chitinase enzyme from *Bacillus* sp. of Kamojang Crater, Indonesia. *Journal of Biochemistry, Molecular Biology, and Biophysics*, 6(4): 279-282.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono, M.T., Ahmad, A., 2010. Production and characterization of chitinase enzymes from Sulili hot spring in South Sulawesi, *Bacillus* sp. HSA, 3-1A. *Indonesian Journal of Chemistry*, 10(2): 263-267.
- Ni, H., Zeng, S., Qin, X., Sun, X., Zhang, S., Zhao, X., Yu, Z., Li, L., 2015. Molecular docking and site-directed mutagenesis of a *Bacillus thuringiensis* chitinase to Improve chitinolytic, synergistic lepidopteran-larvicidal and nematicidal activities. *International Journal of Biological Sciences*, 11(3): 304-315.
- Ohishi, K., Yamagishi, M., Ohta, T., Suzuki, M., Izumida, H., Sano, H., Nishijima, M., Miwa, T., 1996. Purification and properties of two chitinases from *Vibrio alginolyticus* H-8. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82: 598- 600.
- Ohno, T., Armand, S., Hata, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M., Watanabe, T., 1996. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *Journal of Bacteriology*, 178(17): 5065-5070.
- Oke, O.L., Talayi, S.O., Umoch, I.B., 1978. The possible use of chitin and chitosan as animal feed. In *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*, pp. 327-332.
- Oranusi, N.A., Trinci, A.P.J., 1985. Growth of bacteria on chitin, fungal cell walls and fungal biomass, and the effect of extracellular enzymes produced by these cultures on the antifungal activity of amphotericin B. *Microbios*, 43(172): 17-30.
- Orgel, A., Brenner, S., 1961. Mutagenesis of bacteriophage T4 by acridines. *Journal of Molecular Biology*, 3(6): 762-768.

- Özcan, N., 1996a. Ethidium Bromid uygulaması ile  $\alpha$ -amilaz negatif *Bacillus subtilis* mutant suşlarının oluşturulması ve karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 11(4): 87-96.
- Özcan, N., 1996b. Protoplast füzyonu ile *Bacillus stearothermophilus*'a ait sıcaklık dirençli  $\alpha$ -amilaz geninin *Bacillus subtilis* kromozomuna aktarılması. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 11(4): 97-106.
- Pandya, U., Saraf, M., 2015. Purification and characterization of antifungal chitinase from *Bacillus safensis* MBCU6 and its application for production of chito-oligosaccharides. *Biologia*, 70(7): 863-868.
- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.O., Chet, I., Wilson, K.S., Vorgias, C.E., 1994. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure*, 2(12): 1169-1180.
- Prabakaran, M., Thennarasu, V., Mangala, R.A., Bharathidasan, R., Chandrakala, N., Mohan, N., 2009. Comparative studies on the enzyme activities of wild and mutant fungal strains isolated from sugarcane field. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(11): 46-49.
- Raabe, D., Sachs, C., Romano, P., 2005. The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. *Acta Materialia*, 53: 4281-4292.
- Raju, E.V.G., Divakar, G., 2013. Non recombinant mutagenesis of *Bacillus cereus* for fibrinolytic protease production. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*, 2(6): 6189-6201.
- Raju, E.V.G., Divakar, G., Swetha, C., Geetha, J., Satish, P., 2012. Strain improvement of *Aspergillus niger* for glucoamylase by physical and chemical mutagens. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 2(2): 79-91.
- Reddi, P.M., Janardhan, A., Kumar, P., Narasiçha, G., 2012. Induction of chemical mutations in *Aspergillus niger* to enhance cellulase production. *International Journal of Environmental Biology*, 2(3): 129-132.
- Revah-Moiseev, S. Carroad, P., 1981. Conversion of the enzymatic hydrolysis of shell fish waste chitin to single cell protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 1067-1078.
- Riordan, J.F., 1977. The role of metals in enzyme activity. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 7(2): 119-129.

- Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P., 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology*, 134: 169-176.
- Sarvani, V.S., Iyer, P.R., 2012. Isolation, characterization and purification of chitinase from *Penicillium*, *Pseudomonas* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences Paper*, 14(1): 33-38.
- Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N., Kotan, R., 2014. Purification of chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13:35.
- Shubakov, A.A., Kucheryavykh, P.S., 2004. Chitinolytic activity of filamentous fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(5): 445-447.
- Sidhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta, J.K., 1997. Strain improvement for the production of a thermostable  $\alpha$ -amylase, *Enzyme and Microbial Technology*, 21(7): 525-530
- Stephens, N.L., Bough, W.A., Beuchat, L.R., Hatton, E.K., 1976. Preparation and evaluation of two microbial media of shrimp heads and hulls. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(1): 1-6.
- Stryer, L. 1988. *Biochemistry*. Third Ed. W.H. Freeman and Company/New York.
- Takayanagi, T., Ajisaka, K., Takiguchi, Y., Shimahara, K., 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1078(3): 404-410.
- Toharisman, A., Suhartono, M.T., Spindler-Barth, M., Hwang, J-K., Pyun, Y-R., 2005. Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 733-738.
- Vaidya, R., Roy, S., Macmil, S., Gandhi, S., Vyas, P., and Chhatpar, H.S. 2003. Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes xylosoxydans*. *Biotechnology Letters*, 25: 715-717.
- Vaidya, R.J., Macmil, S.L.A., Vyas, P.R., Chhatpar, H.S., 2003. The novel method for isolating chitinolytic bacteria and its application in screening for hyperchitinase producing mutant of *Alcaligenes xylosoxydans*. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 129-134.

- Veda, M., Arai, M., 1992. Purification and some properties of chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(3): 460-464.
- Waldeck, J., Daum, G., Bisping, B., Meinhardt, F., 2006. Isolation and molecular characterization of chitinase-deficient *Bacillus licheniformis* strain capable of deproteinization of shrimp shell waste to obtain highly viscous chitin. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12): 7879-7885.
- Walid, A.L., Khaled, M.G., Ehab, R.E., 2007. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresource Technology*, 98(18): 3464-3469.
- Wang, S.L., Chang, W.T., 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2): 380-386.
- Wang, S-L., Shih, I-L., Liang, T-W, Wang, C-H., 2002. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8): 2241-2248.
- Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., Ohnishi, K., Tanaka, H., 1992. Structure of gene encoding chitinase -D, *Bacillus circulans* wild type 12, and possible homology of the enzyme to other procaryotic chitinase and class-3 plant chitinases. *Journal of Bacteriology*, 174: 408-414.
- Wiwat, C., Siwayaprahm, P., Bhumiratana, A., 1999. Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1. *Current Microbiology*, 39(3): 134-140.
- Yabuki, M., Mizushina, K., Amatatsu, T., Ando, A., Fujii, T., Shimada, M., Yamashita, M., 1986. Purification and characterization of chitinase and chitobiose produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 32: 25-38.
- Yamashiro, K., Yokobori, S., Koikeda, S., Yamagishi, A., 2010. Improvement of *Bacillus circulans* beta-amylase activity attained using the ancestral mutation method. *Protein Engineering, Design and Selection*, 23(7): 519-528.

- Yonneda, Y., 1982. Mutation of *Bacillus subtilis* causing hyperproduction of  $\alpha$ -amylase and protease, and its synergistic effect, *Journal of Bacteriology*, 124(1): 48-54
- Yuli, E.P., Suhartono, T., Rukayadi, Y., Hwang, J.K., Pyun, R.Y. 2004. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2): 147-153.
- Zeki, N.H., Muslim, S.N., 2010. Purification, characterization and antifungal activity of chitinase from *Serratia marcescens* isolated from fresh vegetables. *Ibn Al-Haitham Journal For Pure And Applied Science*, 23(1): 13-25.

## ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı :Burcu DURMAZ

2. Doğum Tarihi :28.05.1989

3. Ünvanı :Biyolog

4. Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Bitirme Yılı
Lisans	Biyoloji Bölümü	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	Biyoloji Anabilim Dalı	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi	-----