

**T.C.**  
**KİLİS 7 ARALIK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİTİN DEASETİLAZ ENZİMİNİN KİSMİ  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Ramazan KARAYILAN**

**DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. H. Aysun MERCİMEK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**MAYIS 2015**

**KİLİS**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Hatice Aysun MERCİMEK danışmanlığında, Ramazan KARAYILAN tarafından hazırlanan “Kitin Deasetilaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışması 21/05/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından ..... ile Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri Ünvanı, Adı Soyadı  
(Kurumu)**

**İmza**

**Başkan** Yrd. Doç. Dr Hatice Aysun MERCİMEK  
(Kilis 7 Aralık Üniv. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji ABD)

**Üye** Prof. Dr. Nazım ŞEKEROĞLU  
(Kilis 7 Aralık Üniv. Meslek Yüksekokulu Bahçe Bitkileri ABD)

**Üye** Yrd. Doç. Dr. Gülcihan GÜZELDAĞ  
(Kilis 7 Aralık Üniv. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji ABD)

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ...../...../201... tarih ve ...../..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Tez No: .....

Bu tez çalışması ..... tarafından desteklemiştir.

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### KİTİN DEASETİLİZ ENZİMİNİN KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Ramazan KARAYILAN

Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. H. Aysun MERCİMEK

Yıl: 2015

Sayfa: 61

Bu çalışmada, kitin polisakkaritinin kitosana biyodönüşümünü katalizleyen ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin, *Bacillus cereus* suşundan kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu analiz edilmiştir. Kolloidal kitin içeren katı besiyerinde 30°C’de bir hafta inkübasyonu takiben kolonisinin etrafında sarı zon gözlenerek seçilen bu izolat, VITEK identifikasyon sistemi ile tanımlanmıştır. Sıvı fermantasyon ortamında geliştirilen hücre kültürlerinin santrifujlenmesi ile elde edilen ham enzim preparatının spesifik aktivitesi 0,274 U/mg olarak belirlenmiştir. Kitin deasetilaz enziminin optimum aktivitesini 50°C ve pH 7.0’da gösterdiği ortaya konmuştur. Enzimin 50°C sıcaklıkta 20 dakika ön inkübasyonu sonrası aktivitenin %115’e kadar arttığı saptanmıştır. 5 mM konsantrasyonda asetik asit (%105), gliserol (%123), CoCl<sub>2</sub> (%113), NaCl (%137) ve CaCl<sub>2</sub> (%102)’ün enzim aktivitesini stimule ettiği, fakat EDTA (%81.12) ve TritonX-100 (%75.5)’ün ise inhibitör ajan olarak davrandığı gözlenmiştir. SDS, 2-merkaptetanol, MgCl<sub>2</sub> ve MnCl<sub>2</sub> varlığında ise aktivitenin sırasıyla %97, %89, %64 ve %83 korunduğu belirlenmiştir. SDS-PAGE analizlerinde, kısmi saflaştırılmış ekstraselüler kitin deasetilaz enzimine ait 39 kDa moleküler ağırlığında tek protein bandı elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Bacillus cereus*, kitin deasetilaz, kısmi saflaştırma, karakterizasyon

## ABSTRACT

Msc. Thesis

### THE PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHITIN DEASETILASE ENZYME

Ramazan KARAYILAN

Kilis 7 Aralık University

The Institute for Graduate Studies in Sciences and Engineering Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. H. Aysun MERCİMEK

Year: 2015

Page: 61

In this study, the partial purification from *Bacillus cereus* strain and characterization of the extracellular chitin deacetylase enzyme, catalyzes the bioconversion of chitin polysaccharide to chitosan, were analyzed. Following the incubation period on solid media containing colloidal chitin at 30°C for one week, this selected isolate by observing the yellow zone around the colony was identified by VITEK identification system. The specific activity of the obtained crude enzyme preparation by centrifugation of cell cultures were developed in the liquid fermentation medium was determined as 0,274 U/mg. The optimum activity of chitin deacetylase enzyme was emerged at 50°C and pH 7.0. After the pre-incubation of enzyme at 50°C for 20 min, its activity was detected to increase up to 115%. It was observed that acetic acid (%105), glycerol (%123), CoCl<sub>2</sub> (%113), NaCl (%137) and CaCl<sub>2</sub> (%102) in 5 mM concentrations stimulated its activity but EDTA (%81.12) and TritonX-100 (%75.5) behaved as the inhibitory agent. In the presence of SDS, 2-mercaptoethanol, MgCl<sub>2</sub> and MnCl<sub>2</sub>, the activity was determined to protect %97, %89, %64 and %83, respectively. In SDS-PAGE analysis, single protein band in 39 kDa molecular weight belonging to the partially purified extracellular chitin deacetylase enzyme was obtained.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, chitin deacetylase, partial purification, characterization

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımın her aşamasında maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen; çalışma azmi, kararlılığı ve fikirleriyle tezimde beni yönlendiren değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. H. Aysun MERCİMEK' e,

Lisans dönemimden beri her konuda desteklerini benden esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü' nün değerli öğretim üyeleri Yrd. Doç. Dr. Gülcihan GÜZELDAĞ ve Yrd. Doç. Dr. Ayşenur ÖZŞAVLI' ya,

Tez yazımı ve laboratuvar çalışmaları sırasında bana yardımcı olan Kilis 7 Aralık Biyoloji Bölümü Arş. Gör. Kıvılcım ÇAKTÜ-GÜLER ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Arş. Gör. Erdal ERTAŞ' a,

Yüksek lisans çalışmalarım süresince bana destek veren sevgili arkadaşlarım; Abdullah KAVAL, İ. Halil ÇELİK, Ömer SOYMAÇ, Kadir AÇAR, Mücahit KAYA' ya ve bana her konuda destek olan, hayatımın tek vazgeçilmezi annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimizin kapsamında kitinin kitosana biyodönüşümünü katalizleyen bakteri izolasyonu ve tanımlanması sürecindeki kimyasal ihtiyacımız, danışmanım tarafından yürütülen TÜBİTAK 113Z569 “Mikrobiyal kaynaklardan antimikrobiyal özellikte kitosan üretimi ve karakterizasyonun araştırılması” konulu 3001-Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programınca desteklenen projemiz tarafından sağlanmıştır. Aynı zamanda projede bursiyer olarak da yer almaktayım. Bu desteklerinden dolayı TÜBİTAK' a teşekkür ederim.

Ramazan KARAYILAN

MAYIS, 2015

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Enzimler .....	1
1.2. Enzimlerin Yapısı.....	2
1.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	3
1.4. Endüstriyel Enzimler .....	4
1.5. Kitin, Kitosan ve Kitin Deasetilaz.....	6
1.5.1. Kitin ve Kitosan .....	6
1.5.2. Kitin Deasetilaz.....	8
1.6. <i>Bacillus</i> .....	11
1.6.1. <i>Bacillus cereus</i> .....	12
1.7. Kaynak Özetleri.....	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM .....	17
2.1. Materyal.....	17
2.1.1. Kullanılan besiyerleri.....	17
2.1.1.1. Kitinolitik aktivite besiyeri .....	17
2.1.1.2. Kitin deasetilaz aktivite besiyeri .....	17
2.1.1.3. Enzim fermantasyon ortamı .....	18
2.1.1.4. Nutrient agar.....	18
2.1.1.5. Laura-Bertani besiyeri.....	19
2.1.1.6. Tryptic Soy Agar (TSA) .....	19
2.1.2. Gram boyama için kullanılan çözeltiler .....	20
2.1.2.1. Kristal viyole .....	20
2.1.2.2. Sulu karbol fuksin (sulu fuksin).....	20

2.1.2.3. Gramın iyodür çözeltisi.....	20
2.1.3. Enzim aktivite tayininde kullanılan çözeltiler .....	20
2.1.3.1. 50 mM sodyum tetraborat-HCl (pH 7.0).....	20
2.1.3.2. Substrat çözeltisinin hazırlanışı.....	20
2.1.3.3. Reaksiyon durdurucu çözeltinin hazırlanışı.....	20
2.1.3.4. Renklendirme çözeltisinin hazırlanışı.....	20
2.1.4. Protein miktar analizlerinde kullanılan araçlar.....	21
2.1.5. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) analizlerinde kullanılan çözeltiler.....	21
2.1.5.1. Solüsyon A (monomer (akrilamid/bis) çözeltisi).....	21
2.1.5.2. Solüsyon B (4X).....	22
2.1.5.3. Solüsyon C (4X).....	22
2.1.5.4. %10'luk SDS.....	22
2.1.5.5. %10 Amonyum Persülfat (AMPS).....	22
2.1.5.6. TEMED (N,N,N,N'-tetramethylene-ethylenediamine).....	22
2.1.5.7. Örnek yükleme tamponu (62,5 mM Tris (pH 6.8), %2 SDS, %10 gliserol, 0,72 M 2-β-merkaptöetanol, %0,05 bromfenol mavisi).....	22
2.1.5.8. Yürütme tamponu (0,025 M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH 8.3)..	23
2.1.5.9. Coomassie brilliant blue R-250 boyama çözeltisi.....	23
2.1.5.10. Yıkama (bağlanmamış boyayı uzaklaştırma 'destaining') çözeltisi .....	23
2.1.6. Enzimin optimum pH aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan tampon çözeltiler.....	23
2.1.6.1. Glisin HCl tamponu .....	23
2.1.6.2. Sitrat tamponu .....	24
2.1.6.3. Sitrat fosfat tamponu .....	24
2.1.6.4. Fosfat tamponu.....	24
2.1.6.5. Tris HCl tamponu.....	25
2.1.6.6. Karbonat bikarbonat.....	25
2.1.7. Kitin deasetilaz aktivitesi üzerine kimyasalların etkisi.....	25
2.2 .Yöntem .....	26
2.2.1. Toprak örneklerinin toplanması.....	26
2.2.2. Besiyeri ortamına eklenecek kolloidal kitin üretimi.....	26

2.2.3. <i>Bacillus</i> sp. izolasyonu .....	27
2.2.4. CDA kültür taraması .....	27
2.2.5. <i>Bacillus</i> sp. tanımlanması .....	27
2.2.5.1 Gram boyama prosedürü .....	27
2.2.5.2. VITEK analizi .....	28
2.2.6. Bakterinin stoklanması .....	28
2.2.7. Enzim üretimi .....	29
2.2.8. Enzimin kısmi saflaştırılması .....	29
2.2.9. Ekstraselüler CDA aktivite tayini .....	29
2.2.10. CDA aktivitesi için kalibrasyon eğrisinin belirlenmesi .....	30
2.2.11. Toplam protein analizi .....	31
2.2.12. Enzimin aktivite gösterdiği optimum pH değerinin saptanması .....	32
2.2.13. Enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın belirlenmesi .....	32
2.2.14. Enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi .....	32
2.2.15. Enzim aktivitesi üzerine kimyasalların etkisi .....	33
2.2.16. CDA enzimin moleküler ağırlığının SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmesi .....	33
2.2.16.1. Ayırma jelinin hazırlanması (%12'lik) .....	33
2.2.16.2. Yükleme jelinin hazırlanması (%5'lik) .....	34
2.2.16.3. Örneğin ve standartın hazırlanması .....	34
2.2.16.4. Enzim örneklerinin SDS-PAGE jeline yüklenmesi ve yürütülmesi .....	34
2.2.16.5. SDS-PAGE jelinin boyanması ve görüntülenmesi .....	34
3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	36
3.1. CDA Üretici <i>Bacillus</i> sp. Suşların İzolasyonu .....	36
3.2. CDA Kültür Tarama Sonuçları .....	37
3.3. <i>Bacillus</i> sp. Suşunun Tanımlanması .....	37
3.4. <i>Bacillus cereus</i> 'un CDA Aktivitesinin Belirlenmesi .....	38
3.5. <i>Bacillus cereus</i> 'un CDA Enziminin Optimum pH Aralığı .....	39
3.6. <i>Bacillus cereus</i> 'un CDA Enziminin Optimum Sıcaklık Aralığı .....	42
3.7. <i>Bacillus cereus</i> 'un CDA Enziminin Termal Stabilitesine Ait Bulgular .....	44
3.8. <i>Bacillus cereus</i> 'un CDA Enzimi Üzerine Kimyasalların Etkisi .....	46
3.9. CDA Enziminin Moleküler Ağırlığının Tespiti .....	49
4. SONUÇ VE YORUM .....	52



5.KAYNAKLAR .....	56
6.ÖZGEÇMİŞ .....	61

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\beta$ :	Beta
$^{\circ}\text{C}$ :	Santigrat derece
$\mu\text{M}$ :	Mikromolar
AMPS:	Amonyum persülfat
atm:	Atmosfer
aw:	su aktivitesi
ATP:	Adenozin Trifosfat
CDA:	Kitindeasetilaz enzimi
dak.:	Dakika
EDTA:	Etilendiaminotetra-asetik asit
g:	Gram
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ :	mikrogram/ mikrolitre
EC:	Enzim Kodu
IUBMB:	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
kDa:	Kilodalton
mM:	Milimolar
mU/ml:	mili unite/mililitre
nm:	Nanometre
pI :	İzoelektrik nokta
rpm:	Dakikada devir sayısı
sp.:	Species (tür)
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE:	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Tris:	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
TEMED:	N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin
U/mg:	Unit/miligram
U/mL:	ünite /mililitre
v/v :	Hacim/Hacim (volume/volume)
w/v:	Ağırlık/Hacim (weight/volume)
%:	Yüzde

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kitinin kimyasal yapısı .....	7
Şekil 1.2. Kitosanın kimyasal yapısı.....	7
Şekil 1.3. Kitin atıklarının kitosana enzimatik dönüşüm aşamaları .....	8
Şekil 1.4. Kitinin kitosana enzimatik dönüşümü .....	9
Şekil 2.1. Besi ortamına eklenecek koloidal kitin .....	26
Şekil 2.2. CDA aktivitesi için çizilen kalibrasyon eğrisi .....	31
Şekil 2.3. Total protein miktar analizi için kullanılan kalibrasyon eğrisi .....	32
Şekil 3.1. Agar ortamında suşların kitonolitik aktivite görüntüsü .....	36
Şekil 3.2. 1, 2 ve 5 nolu suşlara ait kitin deasetilaz aktivitesi.....	36
Şekil 3.3. 1, 2 ve 5 nolu suşa ait fermantasyon ortamına ait kültür tarama sonuçları ....	37
Şekil 3.4. 1, 2 ve 5 nolu suşa ait tanı kağıtları ile tarama sonuçları.....	37
Şekil 3.5. 2 nolu suşun Gr karakterine ait mikroskopik görüntüsü.....	38
Şekil 3.6. Ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin optimum pH'sı .....	40
Şekil 3.7. Ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin optimum sıcaklığı .....	43
Şekil 3.8. Ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin termal stabilitesi.....	45
Şekil 3.9. CDA enzimine ait SDS-PAGE bulguları(Soldan sağa üç kuyucuğada kitin deasetilaz örneğinin yüklendiği SDS-PAGE bulguları; protein markırın SDS-PAGE bulguları).....	50

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bazı enzimlerin kullanım alanları ve kaynakları .....	5
Çizelge 1.2. Bazı organizmalardan elde edilen CDA özellikleri .....	10
Çizelge 2.1. Kitinolitik aktivite besiyeri içeriği .....	17
Çizelge 2.2. Kitin deasetilaz aktivite besiyeri içeriği .....	18
Çizelge 2.3. Enzim üretim ortamı içeriği .....	18
Çizelge 2.4. Nutrient Agar içeriği .....	19
Çizelge 2.5. LB besiyeri içeriği .....	19
Çizelge 2.6. Tryptic Soy Agar besiyeri içeriği .....	19
Çizelge 2.7. Ayırma jelinin içeriği .....	33
Çizelge 2.8. Yükleme jelinin içeriği .....	34
Çizelge 3.1. 2 nolun suşun tanımlanması .....	38
Çizelge 3.2. Ekstraselüler CDA enzimin total ve spesifik aktivitesi .....	38
Çizelge 3.3. CDA üzerine inhibitörlerin, deterjanların ve metal iyonların etkisi .....	47

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Enzimler

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen, aktivasyon enerjisini düşürerek biyokimyasal tepkimeleri hızlandıran protein yapıdaki moleküllerdir. Enzimler çok eski zamanlardan beri canlıların yaşamında önemli bir yer tutmuştur. Canlılığın devamı için hayati önem taşıyan enzimler, medeniyetler tarafından ne oldukları ve nasıl çalıştıkları anlaşılmadan binlerce yıl çeşitli gıda ve malzeme uygulamalarında kullanılmışlardır. Önceleri gıdalarda bu dönüşümün anlaşılamayan bir kuvvet tarafından meydana getirildiği fikri hâkim iken 19. yy başlarında yapılan çalışmalar enzimlerin varlığına ışık tutmuştur.

1833 yılında Fransız kimyagerler Anselma Peyan ve Jean-Francois Persoz malt ekstratından alkol çöktürmesiyle amilaz komplekslerini izole etmiş ve buna diastaz ismini vermişlerdir. Enzim ismi ilk defa 1878 yılında William Kunhe tarafından kullanılmıştır (Christakopoulos, 2012). Eduard Buchner 1897 yılında, maya özütünün şekeri alkole fermente edebildiğini keşfetti ve bunu gerçekleştiren enzimin hücre dışında da aynı fonksiyonu gerçekleştirebildiğini ortaya koymuştur. 1926 yılında James Sumner, kristal halde üreaz enzimini saflaştırmış ve enzimlerin protein yapıda olduğunu ortaya koymuştur. Daha sonra J.H. Northrop ve W.M. Stenley çöktürme yöntemiyle pepsin enzimini izole etmiş ve J. Sumner'ın iddialarının doğruluğunu kanıtlamışlardır. Bu yöntemle ileriki zamanlarda çok sayıda kristalize enzim elde edilmiştir ([www.worthington-biochem.com/introbiochem/enzymes.pdf](http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/enzymes.pdf)). 1965 yılında Phillips ve arkadaşları yumurta akından bakterilerin peptidoglikan hücre duvar yapılarını yıkan lizozim enzimini izole etmişlerdir. Aynı yıllarda X-ışınları kristalografisi ile lizozimin 3 boyutlu yapısı belirlenmiş ve enzimlerin yapısı alanında ilk çalışmalar yapılmıştır. 1960'lı yıllarda Annsen tarafından ribonükleaz üzerine yapılan çalışmalar protein yapısının dinamik doğasına ışık tutarak proteolitik yöntemlerin gelişmesine öncülük etmiştir (Kuzu, 2008).

Enzimlerin yapılarının, etki mekanizmalarının ve kimyasal doğasının anlaşılmasına yönelik yapılan bu çalışmalar günümüz enzim bilgilerinin temelini oluşturmuş ve ileri zamanlarda yapılan çalışmalara ışık tutmuştur.

## 1.2. Enzimlerin Yapısı

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen protein yapıdaki moleküllerdir. Proteinler, peptid bağları ile birbirlerine bağlanmış aminoasit zincirlerinden oluşan yüksek moleküler ağırlığa sahip biyomoleküllerdir. Enzimlerde proteinler gibi uzun aminoasit zincirlerinden oluşurlar ve katlanarak üç boyutlu yapıları meydana getirirler. Enzimlerin etkinliğini üç boyutlu yapıları tarafından belirlenir. Enzimler protein yapısında olduklarından tuzlar, solventler ve diğer reaktifler ile çöktürülebilir ve denatüre edilebilirler ([www.worthington-biochem.com/introbiochem/enzymes.pdf](http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/enzymes.pdf)).

Enzimlerin bazıları sadece protein yapıdadırlar, bu enzimlere basit enzim denilmektedir. Bu enzimlere pepsin, tripsin ve üreaz örnek olarak verilebilir. Birçok enzim ise katalitik aktivitelerini gerçekleştirebilmek için bazı bileşiklerin ya da yan grupların varlığına ihtiyaç duyarlar bu enzimlere konjuge enzim denilmektedir. Burada enzime spesifikliğini veren apoenzim denilen protein kısmıdır. Enzime katalitik aktivitesini veren ise kofaktör (koenzim, prostetik grup ya da metal iyonu) denilen yardımcı gruplardır. Kofaktör ve apoenzimin oluşturduğu aktif komplekse ise holoenzim denilmektedir. (Atasağungil, 1965)

Araştırma konusu olarak enzimleri bu kadar önemli yapan özellikleri reaksiyonları katalizleme özgülüğüdür. Birkaç enzim sadece mutlak özgünlük gösterirken; yani sadece bir reaksiyonu katalizlerken diğer enzimler ise belli bir tür işlevsel grup ya da kimyasal bağ için spesifiktir. Genel olarak enzimler dört tip özgülük gösterirler.

1. **Mutlak özgünlük:** Bir enzimin sadece spesifik bir substratın spesifik bir reaksiyonunu katalizlemesidir.
2. **Grup özgülüğü:** Enzimlerin amino, fosfat ve metil grubu gibi belli bir fonksiyonel grup üzerinde etkili olmasıdır.
3. **Bağ özgülüğü:** Enzimlerin belli bağ tipleri üzerinde etkili olmasıdır.

4. **Stereokimyasal özgünlük:** Enzimlerin sadece belli bir stereoisomer veya optik izomere etki etmesidir ([www.worthington-biochem.com/intro/biochem/enzymes.pdf](http://www.worthington-biochem.com/intro/biochem/enzymes.pdf))

### **1.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması**

Enzimlerin adlandırılması aktif ya da inaktif durumda olmalarına göre yapılmaktadır. Enzimler inaktif durumda ise substratının sonuna –jen eki getirilerek adlandırılırlar. Örneğin; pepsinojen ve kimotripsinojen vb. Enzimin aktif olması durumunda ise genellikle etki ettikleri substratının veya grubun isminin sonuna –az eki getirilerek adlandırılırlar. Örneğin; lipitlere etki eden enzimlerin lipaz, üreye etki eden enzimlerin üreaz olarak adlandırılmaları gibi. Yaygın olarak kullanılmamakla birlikte enzimler, substratlarının sonuna –olitik eki getirilerek de adlandırılabilirler. Örneğin; proteinleri parçalayan enzimlere hem “proteazlar” hem de “proteolitik enzimler” denilmektedir. Bu isimlendirmelerden farklı olarak enzimlerin substratını veya aktivitelerini tanımlamayan pepsin, amilaz, ptyalin ve zimaz gibi deneysel isimlendirmelerde mevcuttur (Megep, 2007).

Enzimlerin isimlendirilmelerinin belirli bir düzene göre yapılmaması ve giderek artan enzim keşifleri aynı enzime farklı isimlerin verilmesi veya farklı enzimlere aynı isimlerin verilmesi gibi karışıklıklara yol açmış ve enzimlerin belli bir düzene göre sınıflandırılması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Enzimler genel olarak iki şekilde sınıflandırılırlar; birincisi enzimlerin salgılanıp aktivite gösterdikleri yerlere göre ekstraselüler (hücre dışı) ve intraselüler (hücre içi) enzimlerdir. İkincisi ise günümüzde bilim dünyasında kabul görülen enzimlerin katalitik aktivitelerine göre sınıflandırılmasıdır. Bu sınıflandırma 1956 yılında Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından oluşturulmuştur. Ve keşfedilecek enzimler içinde adlandırmaya uygun bir terminoloji geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre enzimler 6 gruba ayrılmıştır; (Cuesto, 2014)

**EC 1:** Oksidoredüktazlar; oksidasyon ve redüksiyon tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.

**EC 2:** Transferazlar; fonksiyonel bir grubun transferinden sorumlu enzim grubudur.

**EC 3:** Hidrolazlar; çeşitli bağların hidrolizini katalizleyen enzim grubudur.

**EC 4:** Liyazlar; oksidasyon ve hidroliz dışında başka yollarla çeşitli bağları yıkan enzim grubudur.

**EC 5:** İzomerazlar; moleküller içinde değişiklik yaparak uzay da dizilimlerini değiştiren enzim grubu.

**EC 6:** Ligazlar; kovalent bağlarla iki molekülü birbirine bağlayan enzim grubudur.

Bu sınıflandırılmada grup üyeleri enzim kodu (E.C) denilen 4 rakamla ifade edilmektedir. Örneğin; kitin deasetilaz'ın enzim kodu E.C. 3.5.1.41 şeklindedir. Burada ilk rakam enzimin altı ana gruptan hangisinde yer aldığını, ikinci rakam etki ettiği kimyasal yapı ve fonksiyonel grubu, üçüncü rakam alıcı grubu ve dördüncü rakam ise enzimin seride yerini ifade etmektedir (Boyce ve Tipton, 2001; Majsov, 2011).

#### **1.4. Endüstriyel Enzimler**

Enzimler hakkındaki bilgilerin büyük çoğunluğu yakın tarihe ait olmasına karşın, hayatımızdaki yerleri yüzyıllar öncesine dayanmaktadır. Eski zamanlarda enzimler dolaylı olarak peynir, maya, bira, şarap, sirke gibi gıdaların ve deri, keten, çivit gibi malların üretiminde kullanılmaktadır (Kirk ve ark., 2002).

Enzimler 19. yy ikinci yarısında keşfedilmiş ve o zamandan beri çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır (Mojsov, 2011). İlk olarak 1914 yılında deterjanlarda kullanılan enzimler 1926 yılında protein yapıda olduklarının ortaya çıkarılması ve gelişen üretim teknolojileri sayesinde bugün endüstrinin vazgeçilmez materyalleri arasında yer almaktadır.

Endüstriyel uygulamaların temel prensipleri, en düşük maliyetle en yüksek verimde, endüstriyel öneme sahip ürün elde etmek ve bunu yaparken de mümkün olduğu kadar az miktarda zararsız atıkların ortaya çıkmasıdır. Bu temel prensipler enzimleri endüstriyel uygulamalar için vazgeçilmez bir ürün haline getirmektedir.

Günümüzde çok sayıda enzim, endüstride farklı sektörlerde ve farklı amaçlarla kullanılmaktadırlar. Endüstride kullanılan enzimlerin; %59'nu proteazlar, %28'ni karbohidrazlar (%13'nü alfa amilazlar oluşturmaktadır), %3 lipazlar ve %10'nu diğer enzimler oluşturmaktadırlar. Bu enzimlerin %37 si deterjanlarda, %29 gıda uygulamalarında, %12 tekstilde ve %6 hayvan yemlerinde ve mamalarda



kullanılmaktadır. Ayrıca rekombinant DNA teknolojisinde, kozmetikte, ilaç sanayisinde ve atık su arıtma gibi alanlarda da kullanılmaktadır.

Enzimlerin ana kaynakları bitkiler, hayvansal dokular ve mikroorganizmalar olmakla beraber endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimlerin büyük kısmını mikrobiyal kaynaklı enzimler oluşturmaktadır. Bunun temel nedeni mikrobiyal enzimler hayvansal ve bitkisel enzimlerle kıyaslandığında katalitik aktivitelerinin daha yüksek olması, stabilite, düşük maliyetli üretim, istenmeyen yan ürün oluşturmama ve ihtiyaç halinde istenilen oranlarda kısa sürede elde edilmeleri gibi avantajları olmasıdır (Kıran, 2006). Bazı enzimlerin kullanım alanları ve kaynakları Çizelge 1.1’de özetlenmiştir.

**Çizelge 1.1.** Bazı enzimlerin kullanım alanları ve kaynakları

<b>Enzim</b>	<b>Bazı mikrobiyal kaynaklar</b>	<b>Kullanım alanı</b>	<b>Referans</b>
<b>Amilaz</b>	<i>Bacillus</i> <i>Geobacillus</i>	Tekstil, ilaç, gıda, kâğıt ve bira sanayisinde	Nigam, 2013; Lee ve ark., 2013
<b>Proteaz</b>	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Aspergillus</i>	Deterjan yapımı, tabakhane, gıda endüstrisinde, ilaç	Nigam, 2013; Lee ve ark., 2013
<b>Lipaz</b>	<i>Candida</i> <i>Bacillus</i> <i>Mucor</i> <i>Aspergillus</i>	Gıda, deri, deterjan endüstrisinde	Nigam, 2013; Lee ve ark., 2013
<b>Selüloz</b>	<i>Aspergillus</i> <i>Trichoderma</i> <i>Pleurotus</i>	Glikoz üretiminde, kayıt endüstrisinde, etanol üretiminde	Nigam, 2013; Lee ve ark., 2013
<b>Kitin deasetilaz</b>	<i>Bacillus</i> <i>M. rouxii</i> <i>Morticella</i>	Tarımda biyolojik mücadele, kitin atıklarının biyodönüşümünde	Zhao & ark. (2010)
<b>Ksenilaz</b>	<i>Thermoactinomyces thalophilus</i> <i>Bacillus</i> <i>Humicola insolens</i>	Bira ve kâğıt endüstrisinde, hemiselülozun biyodönüşümünde,	Nigam, 2013; Lee ve ark., 2013
<b>Keratinaz</b>	<i>Bacillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Microbacterium</i>	Yem üretimi, tip, tekstil, deterjan, deri imalatında	Akan, 2010; Nigam, 2013; Lee ve ark., 2013

Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda bu kadar geniş alanlarda kullanılmalarının nedeni, sentetik katalizörlere oranla birçok üstünlüklere sahip olmalarıdır. Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda tercih edilmelerinin nedenleri şu şekilde sıralanabilir;

- Doğal olmaları ve toksik olmamaları
- Substrat özgünlükleri sayesinde istenmeyen yan ürünlerin oluşmasına sebebiyet vermemeleri nedeniyle reaksiyonların kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleşmesi
- Ortalama sıcaklık değerlerinde ve nötr pH değerine yakın koşullarda çalıştıklarından; yüksek basınç, yüksek sıcaklık, yüksek asidik vb. sert koşulları tolere etmeleri ve üretimleri için özel ve pahalı ekipmanlar gerektirmemeleri
- Düşük konsantrasyonlarda da nispeten hızlı çalışırlar ve sıcaklık, pH, enzim miktarının ayarlanması ile reaksiyon hızlarının kontrol edilebilirliği
- Reaksiyonlarının istenilen aşamalarda inaktive edilebilmeleri

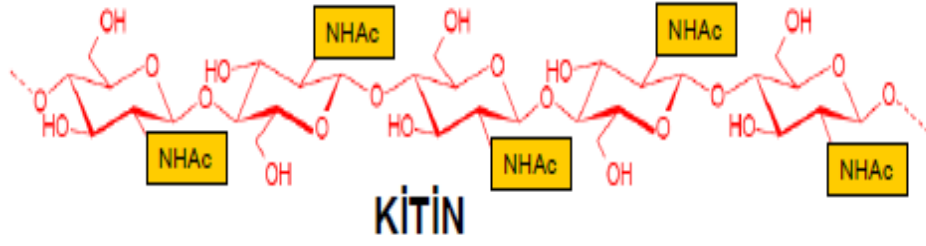
gibi nedenlerden dolayı endüstriyel uygulamalarda tercih edilmektedirler (Underkofler ve ark., 1957).

Ayrıca çoğu endüstriyel uygulamalarda ortaya çıkan sürekli kirleticiler önemli çevre sorunlarına sebebiyet vermektedir. Örneğin; tekstil sektöründe özellikle kimyasal işleme sektörü küresel kirlilikte, her zaman önemli bir paya sahiptir. Enzim gibi alternatiflerin kullanımı bu sorunların ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Mojsov, 2011).

## **1.5. Kitin, Kitosan ve Kitin Deasetilaz**

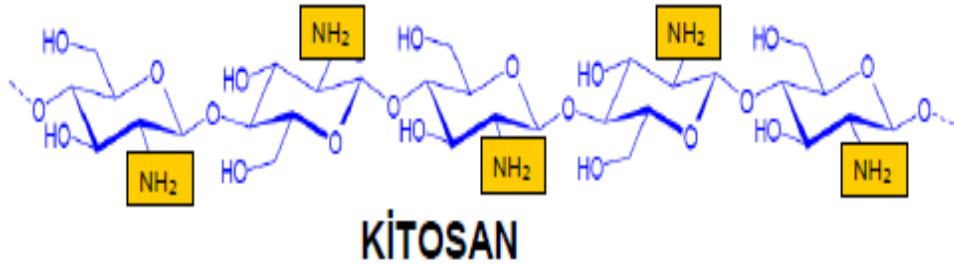
### **1.5.1. Kitin ve Kitosan**

Kitin; N-asetil glukozamin  $\beta$ ,1-4 bağlanmasıyla oluşmuş, doğada selülozdan sonra en fazla bulunan ikinci doğal biyopolimerdir. Yengeç, karides ve ıstakoz gibi deniz kabuklularının dış iskeletinde, böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvar yapılarında bulunmaktadır. Dünyada yıllık üretimi 150.000 ton olan kitin; böcek kabuklarında yaklaşık %23,5 oranında, yengeç karides ve ıstakoz da ise %17 ile %32 arasında değişen oranlarda bulunmaktadır (Demir ve Seventekin, 2009).



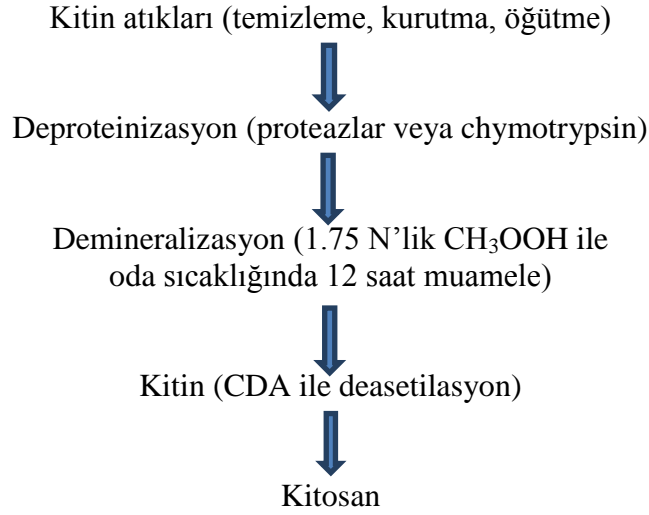
**Şekil 1.1.** Kitinin kimyasal yapısı (Gökçe, 2008.)

Kitosan, ilk kez Prof. C. Rouget tarafından, 1859 yılında derişik potasyum hidroksit çözeltisinde kitinin ısıtılmasıyla bulunmuş ve 1894 yılında Hoppe-Seiler tarafından kitosan olarak adlandırılmıştır (Xavier, 2006). Kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosan 3 adet reaktif fonksiyonel gruba sahiptir. Bu gruplar; C-3 ve C-6 pozisyonundaki iki hidroksil grubu ve C-2 pozisyonundaki amino grubudur. Kitosan yapısındaki bu reaktif fonksiyonel grupların etkileşimi sayesinde kitinin; siyanoetilkitin, kitin ksantojenat, alkalikitin, alkilkitin, karboksialkil kitin, hidroksialkil kitin gibi türevlerinden farklı karakterler sergilemektedir (Gökçe, 2008; De Britto ve ark., 2011; Jiang, 2011; Varesano ve ark., 2011).



**Şekil 1.2.** Kitosanın kimyasal yapısı (Gökçe, 2008.)

Kitinden kitosan elde etmede kimyasal ve enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Enzimlerin reaksiyonlardaki avantajlarından dolayı enzimatik yöntemler, kimyasal yöntemlere oranla daha ön plana çıkmaktadır. Temel de her iki yöntemde de sırasıyla demineralizasyon, deproteinizasyon ve deasetilizasyon işlemleri uygulanmaktadır.



**Şekil 1.3.** Kitin atıklarının kitosana enzimatik dönüşüm aşamaları (Eltaib, 1999)

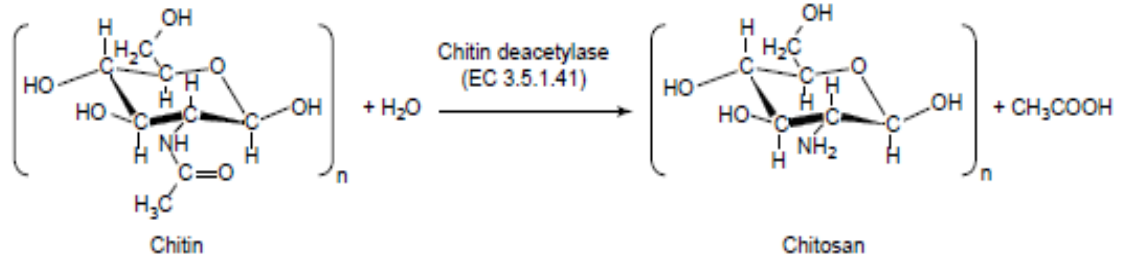
Kitosan katı formunda sarımsı, beyaz, şeffaf, kokusuz ve tatsızdır. Su da çözünmeyen kitosan; asetik, laktik ve formik asit gibi organik asitlerde çözünmesine karşın inorganik asitlerde çözünmesi ise sülfirik ve fosforik asitle sınırlıdır (Goy ve ark., 2009; Jiang, 2011; Kumirska ve ark., 2011).

Sahip olduğu reaktif amino grubu ve hidroksil grupları sayesinde kimyasal reaksiyonlara girebilen ve kimyasal yapısını değiştirebilen ayrıca biyoyumluluk, biyolojik parçalanabilirlik, toksik olmama, antibakteriyel ve anti tümör özellikleri sayesinde tekstil endüstrisinde, medikalde, atık su arıtmada, ziraatta, eczacılık ve gıda sanayisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Tsigos ve ark., 2000; Dutta, 2004.).

### 1.5.2. Kitin Deasetilaz

Kitin deasetilaz (CDA: E.C.3.5.1.41) ise kitinin kitosana biyodönüşümünü katalizleyen önemli bir enzimdir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Enzim Komisyonu (IUBMB) tarafından hidrolazlar (E.C. 3) grubunda sınıflandırılmış ve özel olarak bu enzim-E.C 3.5.1.41- şeklinde numaralandırılmıştır (Eltaib, 1999.).

Kitin deasetilaz (CDA), kitinin yapısındaki N-asetilglikozamin ünitelerindeki asetamid (NHCOCH<sub>3</sub>) gruplarını hidrolize ederek su varlığında asetik asit ve glikozamin birimlerine dönüşümünü katalizlemektedir (Zhao, 2010).



**Şekil 1.4.** Kitinin kitosana enzimatik dönüşümü (Tsigos ve ark., 2000.)

Kitin deasetilaz kaynakları oldukça geniş bir organizma grubu içermesine karşın bu güne kadar yapılan çalışmaların çoğunluğu mantar grupları üzerine yapılmıştır. İlk defa 1975 yılında Araki ve Ito tarafından *Mucor rouxii* mantarının hücre duvarında tespit edilmiş ve kısmen saflaştırılmıştır (Rauchhaus, 2002). O zamandan günümüze kadar CDA varlığı, başta *Mucor rouxii* ve *Colletotrichum lindemuthianum* mantar türleri olmak üzere birçok mantar, böcek, bakteri ve deniz kabuklularında tespit edilmiştir (Cai ve ark., 2013).

Kitin deasetilazın saflaştırıldığı organizma gruplarına, *Mortierella* sp., *Mucor rouxii*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Aspergillus nidulans*, *Scopulariopsis brevicaulis* gibi mantarlar; *Escherichia coli*, *Bacillus thermoleovorans*, *Vibrio* sp., *Bacillus papandayan* gibi bakteriler; *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Helicoverpa armigera*, *Tribolium castaneum*, *Anopheles gambiae* gibi böcekler örnek olarak verilebilir (Dixit ve ark., 2008; Zhao ve ark., 2010; Lixin ve ark., 2012; Cia ve ark., 2013).

Kitinin doğada bu kadar çok bulunması ve türevlerinin kullanım alanlarının her geçen gün artması, paralelinde kitin deasetilaz (CDA) enziminin elde edilmesi ve aktivite özelliklerinin saptanması üzerine yapılan çalışmaların sayısının da artmasına neden olmaktadır.

Enzim aktivitesi; substrat, sıcaklık, ortamın pH, substrat konsantrasyonu, enzimin saflığı ve kaynağa bağlı olarak değişir. Enzimler genelde dar bir pH aralığında aktivite gösterirler fakat kitin deasetilaz geniş bir pH aralığında aktivite göstermektedir. CDA'nın optimum pH'sının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda; genel olarak ekstraselüler enzimlerin pH 7'nin üzerinde, intraselüler enzimlerde ise pH 7'nin altında

optimum aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Optimum pH değeri intrasellüler kitin deasetilaz için 4,5-6 aralığında, ekstrasellüler kitin deasetilaz için 7-12 alkali aralığındadır (Zhao ve ark., 2010.).

Bir polimerin moleküler ağırlığı sentezi ve kullanımı açısından çok büyük önem taşımaktadır. Kitin deasetilaz enziminin moleküler ağırlığı saflaştırıldıkları kaynaklara ve yöntemlere bağlı olarak 25-80 kDa aralığında değişmektedir. Bu aralığın dışında belirlenmiş en yüksek moleküler ağırlık *Colletotricum lindemuthianum* DMS 65144 suşlarından saflaştırılmış ve moleküler ağırlığı 150 kDa olarak belirlenmiştir. Aynı organizmanın ATCC 56676 suşlarında saflaştırılan CDA' nın moleküler ağırlığı ise 32-33 kDa olarak tespit edilmiştir (Zhao ve ark., 2010.).

**Çizelge 1.2.** Bazı organizmalardan elde edilen CDA özellikleri

<b>Kaynak</b>	<b>Optimum sıcaklık (°C)</b>	<b>Optimum pH</b>	<b>Moleküler ağırlık (kDa)</b>	<b>Referans</b>
<i>Bacillus thermoleovorans</i>	80	6	-	Toharisman ve Suhartono, 2008
<i>Mortierella sp.</i>	60	5.5	50-59	Kim ve ark., 2008
<i>Mucor rouxii</i>	50	4.5	75-80	Kafetzopoulos ve ark., 1993
<i>B. papandayan</i>	55	7	-	Rochima ve ark., 2008
<i>S. cerevisiae</i>	50	8	43	Zhao ve ark., 2010
<i>Aspergillus nidulans</i>	50	7	27	Zhao ve ark., 2010

Kitin deasetilaz (CDA;E.C. 3.5.1.41) enzimi sahip olduğu kitinolitik ve antimikrobiyal aktivite sayesinde canlıların saldırma ve savunma mekanizmalarında önemli bir yer tutmaktadırlar. Böcek ve mantarların temel yapılarının kitinden oluşması CDA'nın tarımda fırsatçı patojenlerle mücadelede kullanım alanı bulabilmesine imkân sağlamaktadır. Örneğin fasulyede pas mantarına sebebiyet veren *Uromyces viciae-fabae* mantarına karşı biyolojik mücadelede kullanımı örnek verilebilir. Ayrıca insan, bitki ve hayvanlar da böcek zararlarına karşı biyolojik mücadelede kullanılabilir (Nahar, 2004).

## 1.6. *Bacillus*

*Bacillus* ismi ilk defa 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından kullanılmış ve *Bacillaceae* familyasına dahil edilmiştir. *Bacillus* türlerinin belirlenmesi ve tür farklılıklarının saptanmasında spor ve sporangium morfolojisi esas alınmıştır (Kalkan, 2006). *Bacillus*lar doğada yaygın olarak toprak, su ve çeşitli gıdalarda bulunmaktadır. *Bacillus anthracis* dışında hepsi saprofitik ve genellikle patojenik değildirler.

*Bacillus* sp. türleri aerob veya fakültatif anaerob, hareketli, sporlu çubuklar olup grubunda bulunurlar ve genelde gram pozitiflerdir. Birçok türün hareketi peritrik kamçılar tarafından sağlanır. Vejetatif hücreleri 0.5-1.2 mm eninde ve 2.5-10 mm çapındadırlar. Bütün türleri Nutrient Agar, Kanlı Agar, Brain Heart Infusion, Trypticase Soy Agar gibi besiyerlerinde iyi ürerler. Koloni morfolojileri çeşitlilik gösteren *Bacillus*ların kolonileri genelde beyaz ya da krem renkli olmasına karşın sarı, pembe, portakal rengi ve siyah pigmentli kolonilerine de rastlanır (Kayalı ve Beyatlı, 2003).

Bu cinsin türleri genellikle mezofilik olmakla birlikte psikrofilik, termofilik, asidofilik ve alkalifilik türleri de mevcuttur. Optimum gelişim sıcaklıkları 30-37°C olan *Bacillus*'ların; psikrofilik türleri -5 ile 25°C arasında, termofilik türleri ise 45-75°C optimum gelişim gösterirler. Alkalifilik ve asidofilik türleri ise 2-11 gibi geniş bir pH aralığında gelişim göstermektedirler (Lin, 1997.).

*Bacillus*lar spor ve sporangium morfolojilerine göre 3 gruba ayrılmaktadırlar. Birinci grup *Bacillus* türleri kendi aralarında A ve B şeklinde iki alt gruba ayrılır. A ve B alt gruplarında sporangium şişmemiş, sporlar elips veya silindirik şekilli, sentral veya terminal konumludur. Birbirinden farklı olarak A alt grubunun hücre genişliği 1mm'den küçük, B alt grubunun ise 1mm'den büyüktür. A alt grubuna *B. cereus* ve *B. megaterium*, B alt grubuna ise *B. pumilus* ve *B. subtilis* örnek olarak verilebilir.

İkinci grup *Bacillus* türlerinde sporangia şişmiş, sporlar elips, sentral ve terminaldir. Bu grup üyelerine *B. alvei* ve *B. macerans* verilebilir.

Üçüncü grup *Bacillus* türlerinde de sporangia şişmiş sporlar küresel, subterminal ve terminal konumludur. *B. sphaericus* bu gruba örnektir (Kalkan, 2006.).

### 1.6.1. *Bacillus cereus*

*Bacillus* cinsine ait bir bakteri olan *Bacillus cereus* doğada yaygın olarak bulunmakla birlikte tipik habitatı topraktır. Gram pozitif, sporlu, hareketli ve fakültatif anerobiktir. Sporları ısıya dayanıklıdır. Optimum gelişim sıcaklığı 28-35°C arasında olmakla beraber 5-55°C sıcaklıklarda, 0.93 su aktivitesinde (aw) ve %7,5 tuz konsantrasyonunda gelişim göstermektedirler. Gelişimlerini 4.1-9.3 pH gibi geniş bir aralıkta gerçekleştirmektedirler (Santos, 2000; Horwood, 2005).

*Bacillus cereus* ilk olarak Hauge (1950-1955) tarafından Norveç'te 600 kişiyi etkileyen 4 ayrı zehirlenme vakasında etiyolojik etmen olarak belirtilmiştir. *Bacillus cereus*; lestinaz, jelatinaz, proteaz ve amilaz aktivitesine sahiptir. Doğada en fazla sayıda yaz sonu ve sonbaharda bulunmaktadır (Kalkan, 2006).

Doğal olarak toprakta bulunmakla beraber sporları vasıtasıyla sebzeleri, gıdaları, et ve süt ürünlerini kontamine edebilmektedir. *B. cereus* ile kontamine olmuş gıdaların alımı bireylerde gıda zehirlenmelerine sebebiyet verebilmektedir (Schulz, 2005).



## 1.7. Kaynak Özetleri

Cai ve ark. (2013) *Scopulariopsis brevicaulis* mantarından ekstraselüler kitin deasetilaz üretimi üzerinde kültür ortamının, fermantasyon koşullarının ve farklı inorganik tuzların etkisini incelemişlerdir. 300 mL'lik erlen içerisinde 80 mL %2(w/v) 3,6-O-hidroksilmetilkitin, %1 sukroz, %0.2 NaNO<sub>3</sub>, %0.1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, %0.05 KCl, %0.4 pepton, %0.05 MnSO<sub>4</sub>, %0.03 CoCl<sub>2</sub>, %0.05MgSO<sub>4</sub> içeren optimum kültür ortamının 29°C sıcaklıkta, pH 7'de, 200 rpm min<sup>-1</sup> çalkalama hızında 96 saatlik inkübasyon süresini takiben elde edilen en yüksek enzim aktivitesi 36 U/mL olarak tespit edilmiştir. Kültür ortamına %0.05 MnSO<sub>4</sub>, %0.03 CoCl<sub>2</sub> ve %0.05 MgSO<sub>4</sub> tuzları eklendiğinde, mantarın kitin deasetilaz üretim kapasitesinin sırasıyla %76, %70, %68 arttığı ortaya konmuştur.

Eltaib (1999) *Mucor rouxii* suşundan izole ettikleri kitin deasetilazın karakterizasyonunu çalışmıştır. Enzim, amonyum sülfat çöktürmesini takiben kolon kromatografisi (FPLC) ile saflaştırılmıştır. Enzimin 0-50°C aralığında aktivite gösterdiği ancak optimum aktivite 35°C ve pH 6'da belirlenmiştir. Metal iyonlarından (10mM) CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> ve ayrıca EDTA varlığında, enzim aktivitesinde %35-40 inhibisyona neden olurken aktivitede ki düşüş metal iyonlarının konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı ortaya konmuştur. 25 mM'lık propiyonik asit ve asetik asit varlığında enzimin sırasıyla %40 ve 50 oranında inhibe olduğunu saptanmıştır. Mono Q kolonu (FPLC) kullanılarak saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 21, 23, 26 ve 44 kDa olarak dört bant belirlenmiştir.

Ischaidar ve ark. (2014) tarafından Sulili Pinrang Güney Sulawesi kaplıcalarından izole edilen termofilik bir mikrobiyal suş *Bacillus licheniformis* HSA3-la kullanılarak kitin deasetilaz enzimi saflaştırılmıştır. 72 saatlik fermantasyon sonrası elde edilen enzimin optimum total aktivitesi 0.083x10<sup>-3</sup> U/mL, spesifik aktivite ise 1.206x10<sup>-3</sup> U/mg olarak belirlenmiştir.

Jeraj ve ark. (2006) *Rizopus nigrikans* misellerinden amonyum sülfat çöktürmesi, CM sefaroze ve DEAE selüloz kromatografisi yöntemleriyle CDA saflaştırmışlardır. Substrat olarak glikol kitinin kullanıldığı aktivite analizlerinde total ve spesifik aktivite 44.3 U ve 40.3 U/mg olarak belirlenmiştir. Elde edilen CDA'nın moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 100 kDa olarak saptanmıştır. CDA gen bölgesinin sekans analizi yapılmıştır. 447

aminoasitten sekansını kodlayan 1341 nükleotidlik bir çerçeveyi içeren gen bölgesi belirlenmiştir. Gen dizisi tüm gen bölgesinin %34 oranında polisakkarit deasetilaz kodlayan nükleotidlerden meydana geldiği ve sekanslanan aminoasit dizisinin *Phycomyces blakesleeanus*, *Congronella butleri*, *Rhizopus oryzae* ve *Mucor rouxii* elde edilen CDA ile sırasıyla %55, 48, 43 ve 41 düzeyinde benzerlik gösterdiği belirtilmiştir.

Kafetzopoulos ve ark. (1992) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise *Mucor rouxii* mantar misellerinden saflaştırılan kitin deasetilaz enzimi karakterize edilmiştir. Enzimin optimum aktiviteyi 50°C’de ve pH 4.5’de gerçekleştirdiği ortaya konulmuştur. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE yöntemiyle 75 kDa olarak tespit edilmiş olup izoelektrik noktası oldukça düşük (pI ≈3) bulunmuştur. Enzimin karbonhidrat analizlerinde yüksek bir mannoz glikoprotein olduğu ve karbonhidrat içeriğinin yaklaşık olarak %30 olduğu belirtilmiştir.

Kashyap ve Garg (2014) tarafından SN-1 olarak isimlendirdikleri maya izolatından kitin deasetilaz enziminin saflaştırılma ve üretim ortamının optimizasyon çalışmaları sürdürülmüştür. Optimizasyon veriminin enzim aktivite tayini takip edilerek belirlendiği bu çalışmada, pH 7’ye ayarlanmış fermantasyon ortamında 300 rpm çalkalama hızında 35°C’de 72 saatlik inkübasyonu takiben en yüksek enzim üretimi elde edilmiştir. Farklı karbon ve azot kaynaklarının incelendiği analizlerde, en yüksek aktivite sükroz ve maya varlığında tespit edilmiştir. ZnCl<sub>2</sub> inorganik tuzunun enzim üretimini stimule ettiği ortaya konmuştur.

Nadarajah ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada kitin deasetilaz enzimini *Absidia butleri dr* mantar misellerinden kısmi olarak saflaştırılmıştır. Ekstraselüler enzim eldesi için, miseller asitle yıkanmış kum ve homojenizatör ile ayrı ayrı süspanse edilmiştir. Her iki homojenizasyon sonucu elde edilen aktivite sonuçları sırasıyla, 17.6 mU/mL ve 21.6 mU/mL olarak kaydedilmiştir. İyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi kombinasyonu ile saflaştırılan enzimin 97.6 ve 221.7 kDa ağırlığında CDA1 ve CDA2 olarak adlandırılmış iki izoenzim şeklinde izole edildiği belirtilmiştir.

Kim ve ark. (2008) topraktan izole ettikleri çok sayıda mantar kolonisi arasından *Mortierella sp* DY-52’yi extraselüler kitin deasetilaz üreticisi olarak tespit etmişlerdir.

Morfolojik özellikleri ve 18S rRNA genin nükleotid sekansı esas alınarak karakterize edilen bu suşun %2 glikoz içeren YPD sıvı fermantasyon ortamında pH 5 ve 28°C'de 150 rpm çalkalama hızında 3 günlük inkübasyonu sonrasında en yüksek CDA aktivitesine (20 U/mg) ulaşmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı 50 ve 59 kDa olmak üzere iki izoform içerdiği belirlenmiştir. pH 5.5 ve 60°C'de enzimin en yüksek aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Buna ek olarak, enzimin 4.5-8.0 pH ve 4-40°C sıcaklık aralığında stabilitesini koruduğu saptanmıştır. Co<sup>+2</sup> ve Ca<sup>+2</sup>'nin enzim aktivitesi üzerinde aktivatör etkisi ortaya konmuştur.

Raval ve ark. (2013) *Bacillus cereus*'dan izole ettikleri kitin deasetilaz enzimini kodlayan gen bölgesini pET22b vektör aracılığıyla aktardıkları *E. coli* pLysS suşunda bu enzimin ifadesini ve karakterizasyonunu incelemiştir. SDS-PAGE analizleri ile CDA enzimine spesifik 30 ve 32 kDa ağırlığında iki aktif bant belirlenmiştir. pH 7 ve 37°C'de 20 saat substrat ile inkübasyonu sonucunda enzimin en yüksek aktivitesini gösterdiği saptanmıştır. *E. coli* rekombinant enzimin CO<sup>+2</sup> yokluğunda inaktif olduğu ortaya konmuştur. Cu<sup>+2</sup> metal iyonunun enzim aktivitesi üzerinde negatif etkisi gözlenirken, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup>'nin önemli bir etkisi belirlenmemiştir.

Rochima ve ark. (2008) *Bacillus papandayan*'dan izole ettikleri ekstraselüler CDA enzimini kullanarak kitinin deasetilasyonunu çalışmışlardır. Enzimatik deasetilasyonu takiben elde edilen ve Palupi olarak adlandırdıkları suda çözünebilir kitosan-yeşil çaydan oluşan bir ürün elde etmişlerdir. Enzim aktivitesini 0.005 U/mL olarak belirlemişlerdir. Elde edilen ürünün %0.22 (w/w) su, %0.11 (w/w) karbonat, %0.03 (w/w) protein, %0.002 (w/w) yağ içeriği ve 58.5 kcal enerji verme özelliği ile SNI 01-3722-1995 standartlarına uygun olduğunu saptamışlardır.

Setyahadi ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus* sp. PT2-3 suşundan izole edilen kitin deasetilazın en yüksek spesifik aktivitesi pH 8 ve 60°C'de 0.26 U/mg olarak kaydedilmiştir. 5 mM konsantrasyonda Zn<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup> metal iyonlarının enzim aktivitesini sırasıyla %4.39 ve 7.8 arttırdığı belirlenmiştir. Buna karşın Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+2</sup> metal iyonlarının enzim spesifik aktivitesini sırasıyla % 46.83, 41.22 ve 47.32 azalttığı ortaya konmuştur. Enzim aktivitesinin 60°C'de 60 dakika inkübasyon sonrası

stabilitesini koruduğu ancak sürenin 90 dakikaya uzatılmasıyla aktivitede %15.05 azalma gözlenmiştir.

Tohorisman ve Suhartono (2008) Langoan kaplıca sularından izole ettikleri *Bacillus thermoleovorens* LW-4-11 suşundan amonyum sülfat (%70) çöktürmesi ile saflaştırdıkları kitin deasetilaz enziminin karakterizasyonu çalışmışlardır. 70°C’de 1 saat sıcaklık uygulamasını takiben saflaştırılan enzimin en yüksek spesifik aktivitesi 4.37 mU/mg olarak kaydedilmiştir. Enzimin en yüksek aktivitesini pH 6 ve 80°C’de gösterdiğini tespit etmişlerdir. Enzimin 90°C’de 40 dakika 100°C’de 5 dakika inkübasyon sonrası orijinal aktivitesinin %50’sini kaybettiği belirlenmiştir. 1 mM’lık EDTA’nın enzim aktivitesi üzerine aktivatör etkisi gözlenirken, Zn<sup>+2</sup>, Ni<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Co<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> metal iyonlarının ise inhibitör etkisi rapor edilmiştir.

Tsigos ve Bouriotis (1995) çalışmalarında *Colletotrichum lindemuthianum* mantarının kültür filtratından saflaştırdıkları kitin deasetilaz enzimini karakterize etmişlerdir. Ağırlıkça %67 karbonhidrat içeriği belirlenmiş bir glikoprotein kitin deasetilaz enziminin moleküler ağırlığı ortalama 150 kDa olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık ve pH; 50°C ve 8.5 olarak saptanmıştır. Çeşitli kitin türevleri üzerinde aktivitesini koruduğu belirlenen kitin deasetilazın, karboksilik asitler ki özellikle asetik asitle inhibe olmadığı ortaya konmuştur.

Rouget tarafından 1859 yılında keşf edilmiş ve moleküler ağırlığı 50-2000 kDa arasında değişen lineer polikatyonik bir polisakkarit kitosan poli-β-(1→4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz), bazı mantar hücre duvarlarının yanı sıra deniz diatomları ve alglerin; böcekler ve kabukluların dış iskeletinin yapısal bileşeni olarak bilinen kitinin alkalın deasetilasyonu sonucu kimyasal yöntemlerle üretilebilmektedir (Jiang, 2011; Varesano ve ark., 2011).

Fakat günümüzde iş yükü getiren ve kimyasal kullanımıyla çevreye zarar veren prosesler yerine, endüstriyel öneme sahip polimerlerin üretilmesinde çevre dostu biyoteknolojik yöntemler önem kazanmaya başlamıştır. Bu sebeple çalışmamızda, kitinin kitosana biyodönüşümünü katalizleyen kitin deasetilaz üretici *Bacillus* suşunun izolasyonu, sıvı fermantasyon ortamından ekstraselüler enzim saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan *Bacillus* cinsi mikroorganizma, Mersin ve Karataş sahil toprak örneklerinden izole edilmiştir. Bu tezde enzim üreten suşlarının belirlenmesi, izolasyonu, tanımlanması, enzim saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarında, çeşitli besiyerleri, tampon çözeltiler, ve pH metre (Starter 3000), streil kabin (Class 2), su banyosu (JSWB-22T), yağ banyosu, UV/VIS spektrofotometre (TETRA) otoklav (JSAC-40), etüv (JSOF-050), çalkalamalı inkübatör (JSSI-200C), santrifüj (MİKRO 220R), ışık mikroskobu (Leica), SDS-PAGE cihazı ile temel laboratuvar malzemeleri kullanılmıştır.

#### 2.1.1. Kullanılan besiyerleri

##### 2.1.1.1. Kitinolitik aktivite besiyeri

Kitinolitik aktivite gösteren mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılmıştır.

**Çizelge 2.1.** Kitinolitik aktivite besiyeri içeriği

<b>Besiyeri içeriği (g/L)</b>	
Kolloidal kitin	10
Maya özütü	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5
KCl	0.5
Sodyum Nitrat	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
Agar	15

Yukarıda belirtilen besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 7.0'a ayarlanıp otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dak steril edilmiştir.

##### 2.1.1.2. Kitin deasetilaz aktivite besiyeri

Kitin deasetilaz enzimi üreten suşların belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Toharisman ve Suhartono, 2008).

**Çizelge 2.2.** Kitin deasetilaz aktivite besiyeri içeriği

<b>Besiyeri içeriği (g/L)</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
NaCl	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1
Maya özütü	2
Tripton	1
Kolloidal kitin	10
4-nitroasetinalid	0.5
Agar	15

4-nitroasetinalid hariç besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 7.0'a ayarlanıp otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dak steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 4-nitroasetinalid içeren süspansiyon 0.45 µm'lik steril filtreden geçirilerek besiyerine eklenmiştir.

#### **2.1.1.3. Enzim fermantasyon ortamı**

Sıvı besi ortamında CDA üretimi için kullanılmıştır (Toharisman ve Suhartono, 2008).

**Çizelge 2.3.** Enzim üretim ortamı içeriği

<b>Besiyeri içeriği (g/L)</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
NaCl	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1
Maya özütü	2
Tripton	1
Kolloidal kitin	10

Yukarıda belirtilen besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 7.0'a ayarlanıp otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

#### **2.1.1.4. Nutrient agar**

Mikroorganizmanın stoklanması için eğik katı kültür şeklinde hazırlanarak kullanılmıştır.

**Çizelge 2.4.** Nutrient Agar içeriği

<b>Besiyeri içeriği (g/L)</b>	
Et peptonu	5
Et özütü	3
Agar	15

Çizelge 2.4’de verilen besiyeri içeriği distile su içerisinde çözündükten sonra pH’sı  $7.0\pm 0.2$ ’ye ayarlanıp otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ ’de 1.2 atm basınçta 15 dak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

#### **2.1.1.5. Laura-Bertani besiyeri**

Stok kültürlerin hazırlanması aşamasında mikroorganizmanın aktive edilmesi için kullanılmıştır.

**Çizelge 2.5.** LB besiyeri içeriği

<b>Besiyeri içeriği (g/L)</b>	
NaCl	10
Maya özütü	5
Tripton	5
Agar	15

Çizelge 2.5’de verilen besiyeri içeriği distile su içerisinde çözündükten sonra pH’sı  $7.5\pm 0.22$ ’ye ayarlanıp otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ ’de 1.2 atm basınçta 15 dak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

#### **2.1.1.6. Tryptic Soy Agar (TSA)**

Mikroorganizmanın tanımlanması için yapılan VITEK identifikasyon analizlerinde suşun aktive edilmesi için kullanılmıştır.

**Çizelge 2.6.** Tryptic Soy Agar besiyeri içeriği

<b>Besiyeri içeriği (g/L)</b>	
Kazein peptonu	15
Soya peptonu	5
NaCl	5
Agar	15

Çizelge 2.6’da verilen besiyeri içeriği distile su içerisinde çözündükten sonra pH’sı  $7.3\pm 0.2$ ’e ayarlanıp otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ ’de 1.2 atm basınçta 15 dak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

## **2.1.2. Gram boyama için kullanılan çözeltiler**

### **2.1.2.1. Kristal viyole**

Kristal viyole	0.5 g
Damıtık su	100 mL

### **2.1.2.2. Sulu karbol fuksin (sulu fuksin)**

Bazik fuksin	1 g
Saf su	1000 mL

Bu çözeltinin 10 mL'si 100 mL saf su ile sulandırılarak sulu fuksin hazırlanmıştır.

### **2.1.2.3. Gramın iyodür çözeltisi**

İyot	1 g
KI	2 g
Saf su	300 mL

## **2.1.3. Enzim aktivite tayininde kullanılan çözeltiler**

### **2.1.3.1. 50 mM sodyum tetraborat-HCl (pH 7.0)**

1.906 g sodyum tetraborat tartılıp 50 mL distile suda çözüldükten sonra HCl ile pH 7'ye ayarlanarak son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

### **2.1.3.2. Substrat çözeltisinin hazırlanışı**

50 mM sodyum tetraborat-HCl (pH 7.0) tamponunun 100 mL'sine 0.1 gr glikol kitin eklenerek hazırlanmıştır (Kashyap ve Garg, 2014).

### **2.1.3.3. Reaksiyon durdurucu çözeltinin hazırlanışı**

Enzim aktivite tayininde reaksiyon durdurucu olarak %33'lük asetik asit (v/v) çözeltisi kullanılmıştır (Toharisman ve Suhartono, 2008).

### **2.1.3.4. Renklendirme çözeltisinin hazırlanışı**

**Çözelti 1:** 100 mL distile su içerisine 5 gr NaNO<sub>2</sub> eklenerek %5'lik NaNO<sub>2</sub> (w/v) çözeltisi hazırlanmıştır (Tokuyasu ve ark., 1996; Rochima ve ark., 2008).



**Çözelti 2:** 100 mL distile su içerisine 12.5 gr amonyum sülfamat eklenerek %12.5'lük amonyum sülfamat (w/v) çözeltisi hazırlanmıştır (Tokuyasu ve ark., 1996; Rochima ve ark., 2008).

**Çözelti 3:** 95 mL distile içerisine 5 mL HCl ilave edilerek %5'lik HCl (v/v) çözeltisi hazırlanmıştır (Tokuyasu ve ark., 1996; Rochima ve ark., 2008).

**Çözelti 4:** 100 mL alkol içerisine 1 gr indol eklenerek %1'lik indol (w/v) çözeltisi hazırlanmıştır (Tokuyasu ve ark., 1996; Rochima ve ark., 2008).

#### **2.1.4. Protein miktar analizlerinde kullanılan ayraçlar**

Total protein miktarı analizlerinden kullanılan ayraçlar Lowry ve ark. (1951)'e göre hazırlanmıştır.

**Ayraç A:** 2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tartılarak 0,1 N NaOH içinde çözünmesi ile %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi hazırlanmıştır.

**Ayraç B1:** 1 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O'nun 100 mL saf suda çözünmesi ile %1'lik CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O çözeltisi hazırlanmıştır.

**Ayraç B2:** 2 g Na-K-Tartarat 100 mL saf suda çözünmesi ile %2'lik Na-K-Tartarat çözeltisi hazırlanmıştır.

**Ayraç C:** Kullanılmadan önce 50 hacim ayraç A + 1 hacim eşit oranda karıştırılan ayraç B1 ve B2'nin karıştırılması ile hazırlanmıştır.

**Folin-Ciocalteu Çözeltisi:** 1'e 1,5 oranında saf su ile seyreltilerek kullanılmadan hemen önce hazırlanmıştır.

#### **2.1.5. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) analizlerinde kullanılan çözeltiler**

##### **2.1.5.1. Solüsyon A (monomer (akrilamid/bis) çözeltisi)**

29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamidin bir miktar distile suda çözünmesini takiben çözeltinin son hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak kullanılmıştır. Çözelti koyu renkli/kahverengi şişede kullanılabildiği kadar buzdolabında 4°C'de saklanmıştır. (Temizkan ve Arda, 2004).

#### **2.1.5.2. Solüsyon B (4X)**

75 mL 2 M Tris-HCl (pH 8.8), 4 mL %10'luk SDS ve 21 mL distile su karışımından oluşan tampon kullanılana kadar buzdolabında 4°C'de saklanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

#### **2.1.5.3. Solüsyon C (4X)**

50 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4 mL %10'luk SDS ve 46 mL distile su karışımından oluşan tampon kullanılana kadar buzdolabında 4°C'de saklanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

#### **2.1.5.4. %10'luk SDS**

100 mL distile su içerisinde 10 g SDS çözünerek kullanılana kadar oda sıcaklığında saklanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

#### **2.1.5.5. %10 Amonyum Persülfat (AMPS)**

Polimerizasyon başlatıcı olarak kullanılan 0,5 g amonyum persülfat 5 mL distile su içerisinde çözünerek hazırlanmıştır. Bu çözelti kullanımdan hemen önce hazırlanmalıdır (Temizkan ve Arda, 2004).

#### **2.1.5.6. TEMED (N,N,N,N'-tetramethylene-ethylenediamine)**

Jellerin polimerleşmesi aşamasında katalizör olarak kullanılmıştır.

#### **2.1.5.7. Örnek yükleme tamponu (62,5 mM Tris (pH 6.8), %2 SDS, %10 gliserol, 0,72 M 2-β-merkaptöetanol, %0,05 bromfenol mavisi)**

0,075 g Tris 5 mL distile suda çözüldükten sonra HCl ile pH 6.8'e ayarlanmış 62,5 mM Tris-HCl tamponu, 0,2 g SDS, 1 mL gliserol, 0,0855 mL 2-β-merkaptöetanol, 0,005 g bromfenol mavisi içeren çözeltinin son hacmi distile su ile 10 mL'ye tamamlanmış ve -20°C kullanılana kadar saklanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

#### **2.1.5.8. Yürütme tamponu (0,025 M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH 8.3)**

3 g Tris, 14,4 g glisin ve 1 g SDS distile suda çözünerek tamponun hacmi distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır ve kullanılabildiği kadar buzdolabında 4°C’de saklanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

#### **2.1.5.9. Coomassie brilliant blue R-250 boyama çözeltisi**

Protein bantlarının, SDS-PAGE elektroforez işleminden sonra görünür hale gelmesi için boyama çözeltisi olarak kullanılmıştır. 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası 500 mL metanolde iyice çözündürüldükten sonra 100 mL glasiyel asetik asit eklenen çözeltinin son hacmi distile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlanmıştır. Bu çözelti oda sıcaklığında yaklaşık 6 ay saklanabilir (Temizkan ve Arda, 2004).

#### **2.1.5.10. Yıkama (bağlanmamış boyayı uzaklaştırma ‘destaining’) çözeltisi**

Boyama işleminden sonra, jeldeki boya fazlası geri alınarak bantların daha net görüntülenmesi amacı ile kullanılmıştır. 125 mL metanol, 175 mL asetik asit ve 2200 mL distile su içeren çözelti oda sıcaklığında 1 ay saklanabilmektedir. (Temizkan ve Arda, 2004).

#### **2.1.6. Enzimin optimum pH aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan tampon çözeltiler**

##### **2.1.6.1. Glisin HCl tamponu**

Kitin deasetilazın pH 2.4 ile 2.8’deki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

A: 0.2 M glisin çözeltisi (15.01 g/L)

B: 0.2 M HCl

25 mL A çözeltisi, x mL B çözeltisi ile karıştırılarak son hacim 100 mL tamamlanır.

<u>X</u>	<u>pH</u>
16.2	2.4
8.4	2.8

### 2.1.6.2. Sitrat tamponu

Kitin deasetilazın pH 3-5.8 ve aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

A: 0.1 M sitrik asit çözeltisi (21.01 g/L)

B: 0.1 M sodyum sitrat çözeltisi (29.41 g/L)

x mL A çözeltisi, x mL B çözeltisi ile karıştırılarak son hacim 100 mL tamamlanır.

<u>X</u>	<u>Y</u>	<u>pH</u>
46.5	3.5	3.0
40.0	10.0	3.4
30.0	15.0	3.8
31.5	18.5	4.2
25.5	24.5	4.6
20.5	29.5	5.0
16.0	34.0	5.4
11.8	38.2	5.8

### 2.1.6.3. Sitrat fosfat tamponu

Kitin deasetilazın pH 6.2-6.6 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

A: 0.2 M sitrik asit çözeltisi (19.21 g/L)

B: 0.2 M dibazik sodyum fosfat çözeltisi ( 53.65 g/L)

x mL A çözeltisi, x mL B çözeltisi ile karıştırılarak son hacim 100 mL tamamlanır.

<u>X</u>	<u>Y</u>	<u>pH</u>
16.9	33.1	6.2
13.6	36.4	6.6

### 2.1.6.4. Fosfat tamponu

Kitin deasetilazın pH 7'deki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

A: 0.2 M monobazik sodyum fosfat çözeltisi (27.8 g/L)

B: 0.2 M dibazik sodyum fosfat çözeltisi (53.65 g/L)

x mL A çözeltisi, x mL B çözeltisi ile karıştırılarak son hacim 100 mL tamamlanır.

<u>X</u>	<u>Y</u>	<u>pH</u>
19.5	30.5	7.0

#### **2.1.6.5. Tris HCl tamponu**

Kitin deasetilazın pH 7.4-9 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

A: 0.2 M tris (tris base) çözeltisi (24.2 g/L)

B: 0.2 M HCl

25 mL A çözeltisi, x mL B çözeltisi ile karıştırılarak son hacim 100 mL tamamlanır.

<u>X</u>	<u>pH</u>
20.7	7.4
16.25	7.8
10.95	8.2
6.1	8.6
2.5	9.0

#### **2.1.6.6. Karbonat bikarbonat**

Kitin deasetilazın pH 9.4-10.6 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

A: 0.2 M susuz sodyum karbonat çözeltisi (21.01 g/L)

B: 0.2 M sodyum bikarbonat çözeltisi (29.41 g/L)

x mL A çözeltisi, x mL B çözeltisi ile karıştırılarak son hacim 100 mL tamamlanır.

<u>X</u>	<u>Y</u>	<u>pH</u>
4.75	20.25	9.4
21	14	9.8
16.5	8.5	10.2
21.25	3.75	10.6

#### **2.1.7. Kitin deasetilaz aktivitesi üzerine kimyasalların etkisi**

Enzim aktivitesi üzerine kimyasalların etkisini saptamak amacıyla stok çözeltileri hazırlanmış TritonX-100, asetik asit, gliserol, 2-merkaptetanol, SDS, EDTA, NaCl, CoCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> ve CaCl<sub>2</sub> kullanılmıştır.

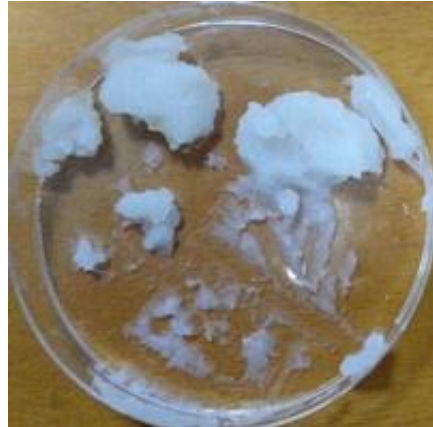
## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Toprak örneklerinin toplanması

Kitinden kitosanın biyodönüşümünü katalizleyen kitin deasetilaz enziminin izolasyonu için, steril cam şişelerde Mersin ve Karataş sahil civarından alınan toprak örnekleri *Bacillus* sp. izolasyonu için hedef materyal olarak değerlendirilmiştir.

### 2.2.2. Besiyeri ortamına eklenecek kolloidal kitin üretimi

1. 5 g toz halindeki kitin içeren 5 L'lik cam burgulu kapaklı şişeye 100 mL konsantre HCl yavaş yavaş ilave edilmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra karışım +4°C'de bir gece yüksek devirde manyetik karıştırıcıda süspanse edilmiştir.
2. Karışıma 2 L soğuk %95'lik etil alkol ilave edilmiş ve bir gece 25°C'de bekletilmiştir.
3. Karışım filtre kağıdından geçirilerek toplanan presipitat 5500 rpm'de 10 dak. +4°C'de santrifuj edilerek bir araya toplanmıştır.
4. Bir araya toplanan presipitat distile su ile iki kez yıkanmış (5500 rpm'de 10 dak. +4°C'de) ve tekrar distile su ile süspanse edilmiştir.
5. Süspansiyonun pH'sı 0.01 N'lik NaOH ile nötralize (pH 7) edilmiştir.
6. Elde edilen nötral presipitat cam bir kaba alınarak oda sıcaklığında 1-2 saat bekletilmiş ve kullanılabileceği kadar +4°C'de karanlıkta saklanmıştır (Kuzu, 2008) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Besi ortamına eklenecek kolloidal kitin

### **2.2.3. *Bacillus* sp. izolasyonu**

Aseptik koşullarda alınan toprak örnekleri steril saf su ile süspanse edilerek 65°C’de 30 dak. su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben seri sulandırma yapılarak 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-5</sup> ve 10<sup>-8</sup> sulandırma katsayılarından 100 µL alınıp kitinolitik aktivite besiyerine yayma preparasyon şeklinde inoküle edilmiş ve petri plakları 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu besiyerinde suşların kitinaz enzimini sentezleme karakterleri araştırılmıştır. Bu besiyerinde kolonilerinin etrafında şeffaf zonlar gözlenen suşlar seçilmiş ve kitin deasetilaz tarama besiyerine çizgi ekim şeklinde inoküle edilmiştir. 30°C’de 1 hafta etüvde inkübasyona bırakılan kültürlerde kolonin etrafında sarı zonlar gözlenen suşlar CDA üretici suşlar olarak belirlenmiş ve tanımlanma çalışmalarına başlanmıştır.

### **2.2.4. CDA kültür taraması**

Agar ortamında seçilen suşların, sıvı besiyerinde de CDA aktivitesini gösterdiklerinin belirlenmesi için kültür taraması yapılmıştır. Bunun için 1 g maya özütü, 0.4 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 0.15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8) içeren fermantasyon ortamına inoküle edilen suşlar, 25°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besi ortamının 2 mL’si, etanolde çözdürülmüş 4-nitroasetanilid emdirilen ve akabinde havada kurutulularak hazırlanan tanı kağıtlarını içeren steril bir test tüpüne aktarılarak 25°C’de 12-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben kağıtlarda ve sıvı fermantasyon ortamında sarı renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Kaur ve ark., 2012).

### **2.2.5. *Bacillus* sp. tanımlanması**

Tiplendirme çalışmaları öncelikle Gr davranışı belirlenen suşa uygun VITEK kiti kullanılarak tür düzeyinde analiz edilmesiyle sürdürülmüştür. VITEK analizleri Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümünde yapılmıştır.

#### **2.2.5.1 Gram boyama prosedürü**

1. Maşa ile tutulan lamın her iki yüzeyi bunzen beki alevinden geçirilerek temizlenmiştir.

2. Bakterinin 24 saatlik taze kültüründen steril koşullarda öze ile örnek alınmış ve alınan örnek lam üzerine konulan 1 damla saf su içerisinde süspanse edilerek lama yayılmıştır. Preparat havada kurumaya bırakılmıştır.
3. Lamın yüzeyine yayılan örnek kısmı yukarıda kalacak şekilde 3 kez hızlıca bunzen beki alevinden geçirerek sıcaklıkla tespit işlemi yapılmıştır.
4. Lam üzerindeki sürüntüyü örtecek kadar kristal viyole konularak 1 dak. bekletilmiştir. Süre sonunda boya dökülerek lam çeşme suyuyla yıkanmıştır.
5. Lam üzerindeki sürüntüyü örtecek kadar gramın iyodin çözeltisinden konularak 1 dak. bekletilmiştir. Süre sonunda boya dökülmüş ve lam önce çeşme suyunda sonra lamdan boya akmayana kadar %95'lik etil alkolde yıkanmıştır.
6. Yıkamadan sonra zıt boya olan sulu fuksin sürüntüyü örtecek şekilde konulup 30-60 sn. kadar bekletilmiştir.
7. Süre sonunda boya dökerek lam çeşme suyuyla yıkanmış. Ve filtre kağıdı ile kurutulup immersiyon yağı damlatarak 100'lük objektifte incelenmiştir.

#### **2.2.5.2. VITEK analizi**

CDA aktivitesi belirlenen suş Triptik Soy Agar (TSA)'da 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 3 mL %0.45-0.5 NaCl (pH 4.5-7.0) içeren tüplere 1 gecelik kültürden öze dolusu inoküle edilerek, tüplerin Mac-Farland bulanıklığı 0.5-0.63 olacak şekilde ayarlanmıştır. Gr boyanma karakterlerine uygun kitler kullanılarak tiplendirmek üzere suş cihaza yüklenmiştir.

#### **2.2.6. Bakterinin stoklanması**

Tiplendirilmesi yapılmış bakteri enzim üretim çalışmalarında kullanılmak üzere saklanmıştır. Bunun için LB brothda 37°C'de geliştirilmiş 1 gecelik taze kültürlerden, toplam hacmin %30'u steril gliserol olacak şekilde steril eppendorf tüplerine aktarılıp suşlar -20°C'de saklanmıştır. Suşlar gliserol stoklamanın yanı sıra Nutrient Agar içeren tüplerde eğik katı şeklinde hazırlanmış kültürlerle her 6 ayda bir pasajlama yapılarak da muhafaza edilmiştir.



### **2.2.7. Enzim üretimi**

Kültür taraması sonucunda CDA aktivitesi belirlenen suş, içerisinde 5 mL fermantasyon besiyeri bulunan tüplere inoküle edilerek 37°C'de 24 saat 180 rpm'de çalkalamalı koşullarda ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben, bir gecelik kültür aynı besiyerinin 95 mL'sini içeren 500 mL'lik burgulu kapaklı şişelere aktarılarak 37°C'de 180 rpm çalkalama hızında 72 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda saflaştırma basamakları uygulanmıştır.

### **2.2.8. Enzimin kısmi saflaştırılması**

Çalkalamalı koşullarda 72 saatlik inkübasyonu takiben kültür, steril falkon tüplere alınarak 5500 rpm'de +4°C'de 45 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonrasında pelletten ayrılan süpernatant steril falkon tüplerine aktararak ham enzim preparatı olarak değerlendirilmiştir. Alkol presipitasyonu için, süpernatant %96'lık soğuk etanol ile toplam hacim 50 mL olacak şekilde 1:9 oranında karıştırılarak 1 gece -20°C'de bekletilmiştir. Alkol süspansiyonu 5500 rpm de +4°C'de 30 dak santrifüj edildikten sonra pellet halinde konsantre olmuş enzim 0.2 M Na-fosfat (pH 7) tamponunda çözülerek aktivite analizlerinde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

### **2.2.9. Ekstraselüler CDA aktivite tayini**

CDA aktivite tayini Rochima ve ark. (2008) ve Setyahadi ve ark. (2006)'nın bildirdiği prosedüre göre sürdürülmüştür.

1. 50 mM sodyum tetraborat-HCl tamponu (pH 7.0) içerisinde hazırlanmış %0.1'lik (w/v) glikol kitinin 150 µL ve 150 µL enzim süspansiyonu eklenerek reaksiyon başlatılmıştır.
2. 30°C'de 30 dak inkübe edilen karışıma 200 µL %33'lük asetik asit eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır.
3. 200 µL % 5'lik NaNO<sub>2</sub> (w/v) eklenerek karışım renk oluşumu sağlanması için 10 dak sürekli olmamak kaydıyla oda sıcaklığında vortekslenmiştir.
4. Reaksiyon karışımına 200 µL %12,5'lik (w/v) amonyum sülfamat ilave edilerek oda sıcaklığında çalkalamalı olarak 30 dak inkübe edilmiştir.

5. İnkübasyon sonrası 800 µL %5'lik HCl ve 80 µL %1'lik indol eklenerek karışım 10 dak kaynatılmıştır.
6. Çeşme suyunda soğutulan tüpler 492 nm dalga boyunda UV-Visible spektrofotometrede incelenmiştir. Aktivite tayinleri sırasında kontrol grubu olarak enzim bulundurmeyen örnekler kullanılmıştır. Ve aşağıda verilen formüle göre aktivite hesaplanmıştır. Tüm aktivite deneyleri iki tekrarlı yürütülmüştür.

### **Aktivite hesabı**

$$\text{Enzim aktivitesi} = \frac{W \times V \times 1000}{VE \times t \times M}$$

W: Açığa çıkan glukosamin miktarı (OD492/Standart grafikten elde edilen eğim),

VE: Enzim hacmi,

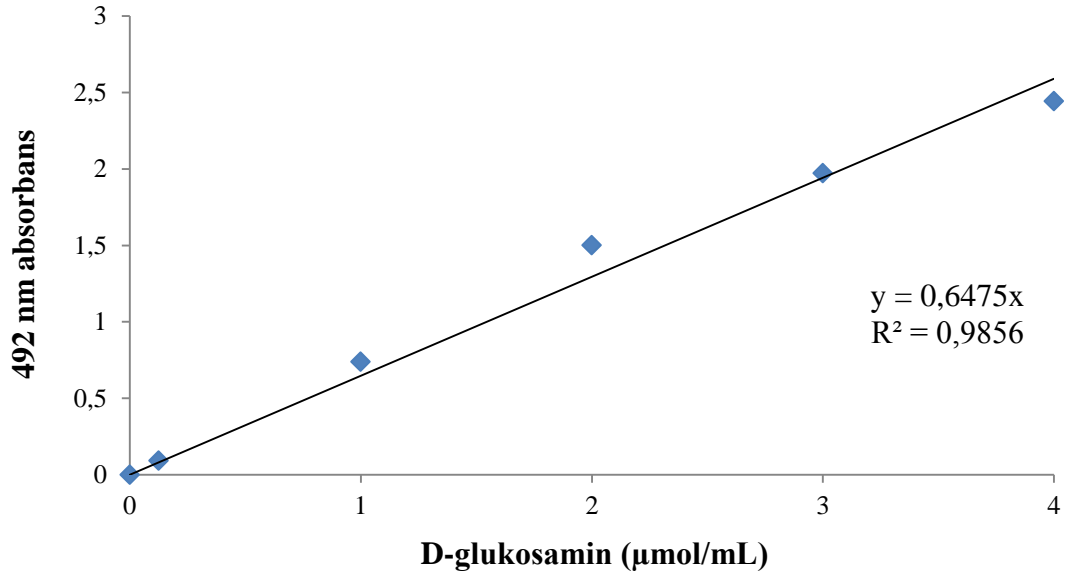
V: Reaksiyon çözeltisi hacmi,

t: Reaksiyon süresi,

M: Glukosaminin atom ağırlığı (205 g/mol)

### **2.2.10. CDA aktivitesi için kalibrasyon eğrisinin belirlenmesi**

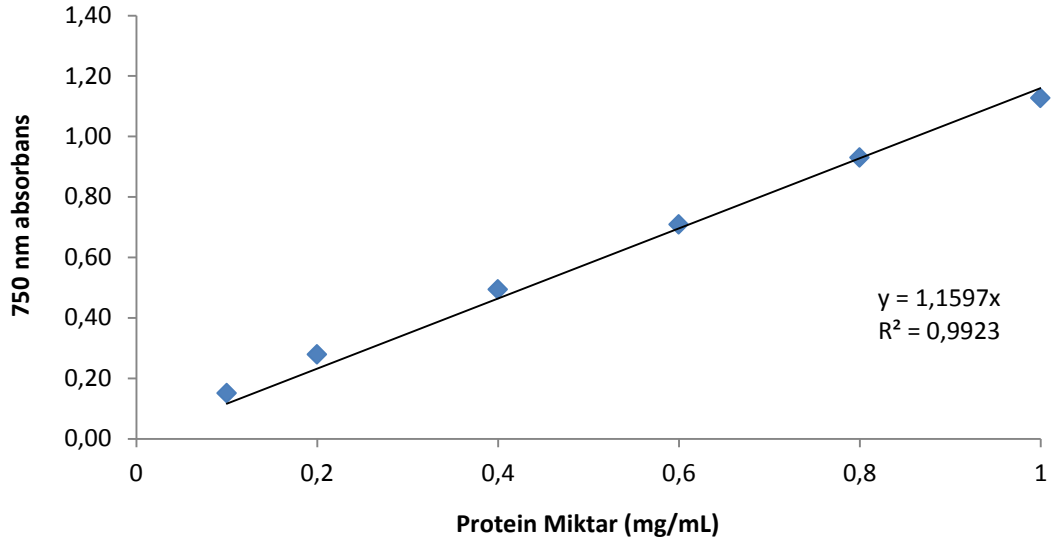
CDA enzim aktivitesi, enzim ve substratın reaksiyonu sonunda çıkan ürün miktarı cinsinden çizdirilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen eğim değeri ile hesaplanmıştır. Bunun için 0.125, 1, 2, 3 ve 4 µmol/mL konsantrasyonlarda D-glukosamin çözeltileri hazırlanmış ve standart aktivite tayin metodu uygulanarak 492 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Hazırlanmış konsantrasyonların absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. CDA aktivitesi için çizilen kalibrasyon eğrisi

#### 2.2.11. Toplam protein analizi

Lowry ve ark. (1951) metodu uygulanarak enzim örneklerindeki protein miktarı belirlenmiştir. Bu metoda göre sığır serum albüminin saf suda 100-200-400-600-800-1000 µg/mL olacak konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlanmıştır. Standart çözeltilerden ve örneklerden 0,3 mL alınarak üzerlerine 3 mL ayraç C eklenmiş ve 15 dak oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Renklendirme çözeltisi olarak, inkübasyon süresini takiben karışıma 0,3 mL Folin-Ciocalteu ayırıcı eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dak bekletilen örnekler protein içermeyen kontrol grubuna (kör) karşı 750 nm absorbansta okutulmuştur. Standart çözeltideki protein miktarlarına karşılık okunan absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki Şekil 2.3’de verilmiştir. Elde edilen eğim değerinden enzim örneklerindeki total protein miktarı hesaplanmıştır.



**Şekil 2.3.** Total protein miktar analizi için kullanılan kalibrasyon eğrisi

### 2.2.12. Enzimin aktivite gösterdiği optimum pH değerinin saptanması

Kısmi saflaştırılmış enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için Glisin-HCl (pH 2.4-2.8), Sitrat (pH 3.0-5.8), Sitrat Fosfat (pH 6.2-6.6), Na-Fosfat (pH 7.0), Tris-HCl (pH 7.4-9.0) ve Karbonat-Bikarbonat (pH 9.4-10.6) tamponları kullanılarak farklı pH değerlerindeki tampon içerisinde %0.1'lik (w/v) glikol kitin substrat çözeltisi hazırlanarak aktivite analizlerine belirtilen tayin metoduyla devam edilmiştir.

### 2.2.13. Enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın belirlenmesi

Kısmi saflaştırılmış enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması amacıyla enzim; 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 ve 120°C'lik sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. 20-80°C aralığındaki inkübasyon su banyosunda, 90-120°C aralığındaki ise yağ banyosu sürdürülmüştür. En yüksek aktivitenin hesaplandığı pH değerindeki tamponda hazırlanmış substrat ile enzim karıştırılarak yukarıdaki seçilen sıcaklıklarda standart aktivite tayini yapılmıştır.

### 2.2.14. Enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi

Enzimin termal stabilite analizleri 50°C'lik sıcaklıklarda 0-5-10-15-20-25-30 dakika ön inkübasyona tabii tutulmuştur. Ön inkübasyona takiben optimum pH değerinde hazırlanmış substrat çözeltisi ile enzim optimum aktivitenin belirlendiği sıcaklık

değerinde aktivite analizi uygulanmıştır.

### 2.2.15. Enzim aktivitesi üzerine kimyasalların etkisi

Enzim aktivitesi üzerine kimyasalların etkisini saptamak amacıyla stok çözeltileri hazırlanmış asetik asit, gliserol, 2-merkaptetanol, TritonX-100, NaCl, SDS, EDTA, CoCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> ve CaCl<sub>2</sub>'ün son konsatrasyonu 5 mM (5 µL çözelti ve 95 µL enzim süspansiyonu) olacak şekilde enzim süspansiyonu karıştırılarak 37°C'de 1 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Optimum aktivitenin gözlemlendiği pH değerinde hazırlanmış substrat çözeltisi ile optimum sıcaklıkta aktivite tayini yürütülmüştür.

### 2.2.16. CDA enzimin moleküler ağırlığının SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmesi

*Bacillus* sp.'den kısmi saflaştırılan CDA enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir (Temizkan ve Arda, 2004).

#### 2.2.16.1. Ayırma jelinin hazırlanması (%12'lik)

**Çizelge 2.7.** Ayırma jelinin içeriği

<b>Solüsyonlar</b>	<b>Miktar</b>
Sol A	8 mL
Sol B	5 mL
Distile su	7 mL
AMPS (%10)	66 µL
TEMED	15 µL

Çizelge 2.7 verilen miktarlarda Solüsyon A, Solüsyon B ve distile su şişe içerisine aktarılıp 5 dakika degaz işlemi yapılarak moleküler oksijeni uzaklaştırılan karışıma AMPS ve TEMED eklenmiştir. Ve jel içeriği enjektör yardımıyla jel kasetlerine yeterli miktarlarda doldurulmuştur. Jelin üst yüzeyi atmosferik oksijenin jele difüzyonunu engellemek ve düzgün bir yüzey elde etmek için ince bir saf su tabakası ile kapatılmıştır. Jelin polimerizasyonunun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 30-60 dakika süreyle beklenmiştir.

### 2.2.16.2. Yükleme jelinin hazırlanması (%5'lik)

Çizelge 2.8. Yükleme jelinin içeriği

<u>Solüsyonlar</u>	<u>Miktar</u>
Sol A	1,5 mL
Sol C	2,25 mL
Distile su	5,25 mL
AMPS (%10)	30 µL
TEMED	10 µL

Çizelge 2.8' de belirtilen miktarlarda Solüsyon A, Solüsyon C ve distile sudan oluşan karışımın ayırma jelinde ifade edilen şekilde havası alındıktan sonra AMPS ve TEMED eklenerek elde edilen yükleme jeli, polimerize ayırma jelinin üzerine enjektör yardımıyla dökülüp, yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilmiştir. Bu işlem sırasında tarağın dişlerinin altında hava kabarcığı sıkışmamasına dikkat edilmiştir. Jelin polimerizasyonu için oda sıcaklığında 30-60 dakika süreyle bekletilmiştir. Polimerizasyon süresi tamamlandıktan sonra tarak kuyucukların bozulmamasına dikkat edilerek yavaşça bir taraftan başlayarak kaldırılmıştır.

### 2.2.16.3. Örneğin ve standartın hazırlanması

Saflaştırılmış CDA enzimi örnek yükleme tamponu ile eşit hacimde eppendorf tüpü içerisinde karıştırılarak 5 dakika 95°C'de kaynar su banyosunda denatüre edilmiştir. Aynı işlem standart (markır) protein karışımı içinde uygulanmıştır. Markır olarak 10.5 ve 175 kDa moleküler ağırlığındaki Opti-Protein Markır (Cat G252) kullanılmıştır.

### 2.2.16.4. Enzim örneklerinin SDS-PAGE jeline yüklenmesi ve yürütülmesi

CDA örneği 20 µL, markır protein ise 5 µL miktarlarda kuyucuklara yüklenmiştir. Jellerin bulunduğu kaset, yükleme işleminin gerçekleştirilmesi ardından elektroforez tankına yerleştirilmiştir. İşaretleli yere kadar yürütme tamponu doldurulmuş elektroforez sistemi güç kaynağına bağlanarak ilk yarım saat 80 V sonra 120 V akımda yaklaşık 6 saat kadar yürütülmüştür.

### 2.2.16.5. SDS-PAGE jelinin boyanması ve görüntülenmesi

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra cam plakalar arasından dikkatlice çıkarılan jel CBB R-250 boyama çözeltisi ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 2 saat

bekletilerek boyanmıştır. Protein bantlarının görüntülenmesi için boyama işleminden sonra jel öncelikle bir iki kez saf suda yıkanmıştır. Jele bağlanmış fazla boyanın uzaklaştırılması için birkaç kez boyayı geri alma çözeltisi değiştirilerek jel oda sıcaklığında 1 gece boyunca geri alma solüsyonunda çalkalayıcı üzerinde bekletilmiştir. Jelin daha parlak görüntülenmesi için %10 gliserol içeren çözeltide 3 saat bekletilerek şeffaflaşma sağlanmıştır. Böylelikle protein örneklerine bağlanan boya dışında jelin diğer bölgelerindeki boyanın uzaklaştırılması ile bantların çıplak gözle görünmesi sağlanmıştır.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

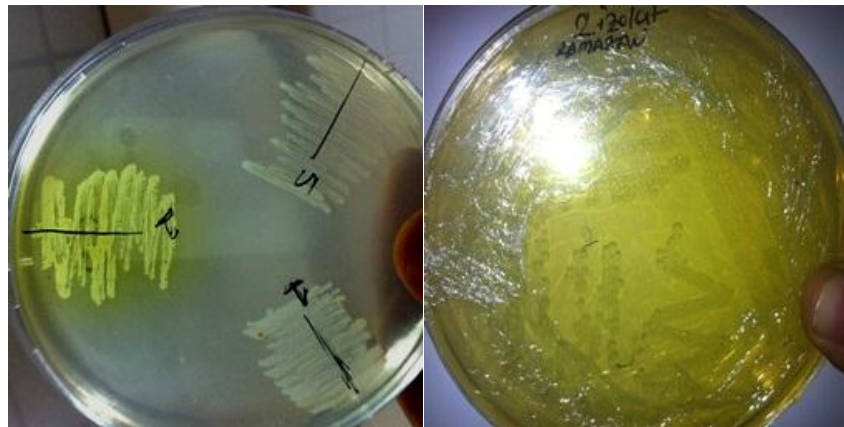
#### 3.1. CDA Üretici *Bacillus* sp. Suşların İzolasyonu

Karataş ve Mersin civarından alınan toprak örneklerinden, kitinolitik aktivitelerine bağlı olarak kolonileri etrafında şeffaf zon gözlenen 3 adet suş izole edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Agar ortamında suşların kitinolitik aktivite görüntüsü

Besi ortamındaki koloidal kitini parçalayan 1, 2 ve 5 nolu izolatlardan, kitinin kitosana biyodönüşümünü katalizleyen kitin deasetilaz enzim üretici suşların seçimi için CDA tarama besiyerine inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonucu kolonisinin etrafında sarı zon gözlenen 2 nolu suş enzim üretim çalışmaları için stoklanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. 1, 2 ve 5 nolu suşlara ait kitin deasetilaz aktivitesi



Kashyap ve Garg (2014) kitin deasetilaz üretici suşların izolasyonu sırasında 2-3 günlük inkübasyonu takiben SN-1 izolatına ait petri plaklarında sarı kolonilerin oluşumunu gözlemişlerdir. Zhou ve ark. (2010) tarafından yapılan diğer bir çalışmada da sekans analizi sonucunda *Bacillus amyloliquefaciens* ile %99 benzerlik gösteren Z7 suşunun petri kültürlerinde kitin deasetilaz üretimine yönelik sarı kolonilerin oluştuğu belirlenmiştir.

### 3.2. CDA Kültür Tarama Sonuçları

Agar ortamında seçilen bu suşların, kültür taraması sonuçlarında da sadece 2 nolu suşa ait fermantasyon kültür ortamının ve tanı kağıtlarının renginin sarıya dönüşmesi ile CDA üreticisi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.3 ve 3.4).



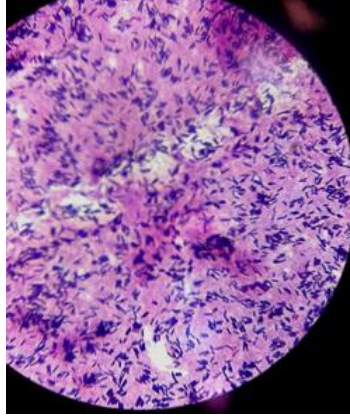
Şekil 3.3. 1, 2 ve 5 nolu suşa ait fermantasyon ortamına ait kültür tarama sonuçları



Şekil 3.4. 1, 2 ve 5 nolu suşa ait tanı kağıtları ile tarama sonuçları

### 3.3. *Bacillus* sp. Suşunun Tanımlanması

Gr davranışı açısından sporlu Gr + olduğu belirlenen CDA üretici suş (Şekil 3.5), VITEK analizi ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Bu analize göre suş *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 3.1).



Şekil 3.5. 2 nolu suşun Gr karakterine ait mikroskopik görüntüsü

Çizelge 3.1. 2 nolun suşun tanımlanması

Bakteri no	Tiplendirme Sonucu	% İdentifikasyon Başarısı
2	<i>Bacillus cereus</i>	95

#### 3.4. *Bacillus cereus*'un CDA Aktivitesinin Belirlenmesi

72 saatlik inkübasyonu takiben santrifujleme ve alkol presipitasyonu ile kısmi olarak saflaştırılmış enzim preparatlarının total ve spesifik aktiviteleri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Ekstraselüler CDA enzimin total ve spesifik aktivitesi

Örnek	Total Aktivite (EU/mL/min)	Total Protein miktarı (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham enzim	0,181	0,66	0,274	100	1
Alkol presipitasyonu	0,043	1,50	0,028	23,76	0,102

Bu aktivite sonuçlarına göre hücre kültürlerinin santrifujlenmesi ile elde edilen ham enzim preparatının total aktivitesinin (0,181 EU/mL/min), alkol presipitasyonu sonucu kazanılan preparata oranla (0,043 EU/mL/min) daha yüksek bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Preparatların total protein miktarları incelendiğinde, alkol presipitasyonu sonucu elde edilen örnekteki protein miktarının (1,50 mg/mL) daha fazla olmasına karşın, total ve spesifik aktivitenin ve saflaştırma veriminin ham enzim preparatına göre düşük olması bu kısmi saflaştırma metodunun CDA üretimi için uygun bir yöntem

olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak, karakterizasyon çalışmalarına ham enzim preparatı ile devam edilmiştir.

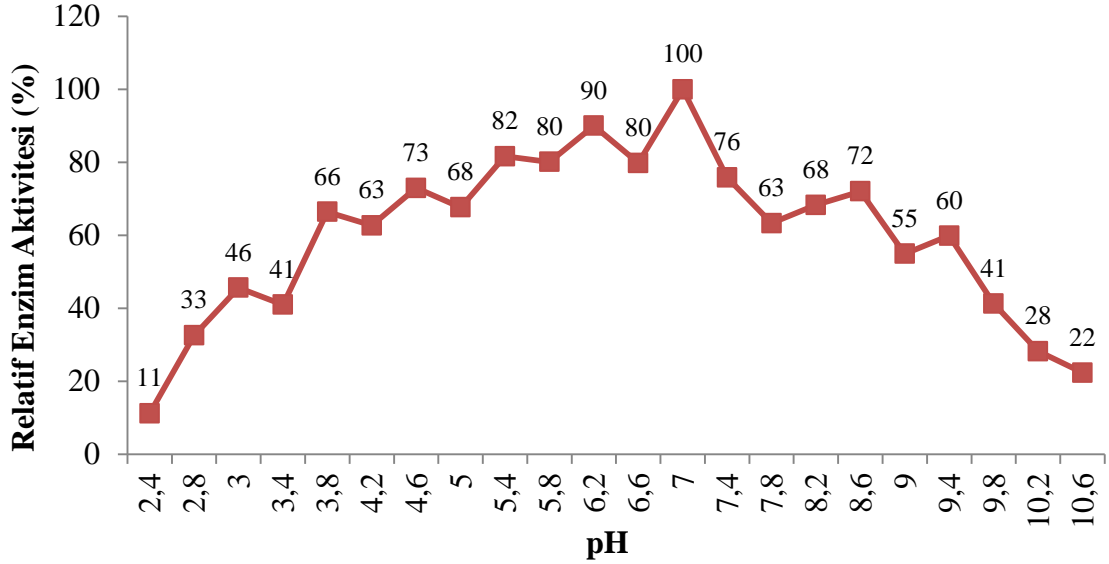
Ischaidar ve ark. (2014) *Bacillus amyloliquefaciens* HSA3-la suşundan saflaştırdıkları kitin deasetilaz enziminin optimal koşullarda en yüksek total aktivitesini  $0.08322 \times 10^{-3}$  U/mL, spesifik aktivitesini ise  $1,206 \times 10^{-3}$  U/mg olarak belirlemişlerdir. Bu denli düşük aktivitede bile enzimi biotermitisid olarak kullanmışlardır. Farklı bir çalışmada ise, *Bacillus papandayan*'dan saflaştırılan ekstraselüler CDA'nın total enzim aktivitesini 0.005 U/mL olarak saptanmıştır (Rochima ve ark., 2008). Başka bir çalışmada ise *Mucor rouxii* (ATCC 24905) suşundan saflaştırılan ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin total aktivitesi 0.02 U/mL olarak tespit edilmiştir. ElMekawy ve ark. (2013) *Alcaligenes* sp. ATCC 55938 suşundan saflaştırıldıkları ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin 18 saatlik inkübasyon sonrası immobilize ve süspanse hücrelerin her ikisi için ortalama 0.38 U/mL total aktivite belirlemişlerdir.

### **3.5. *Bacillus cereus*'un CDA Enziminin Optimum pH Aralığı**

*Bacillus cereus*'dan kısmi olarak saflaştırılan ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için Glisin-HCl (pH 2.4-2.8), Sitrat (pH 3.0-5.8), Sitrat Fosfat (pH 6.2-6.6), Na-Fosfat (pH 7.0), Tris-HCl (pH 7.4-9.0) ve Karbonat-Bikarbonat (pH 9.4-10.6) tampon sistemleri kullanılarak aktivite analizleri sürdürülmüştür. Farklı pH aralıklarında elde edilen relatif enzim aktivitesi (%) Şekil 3.6'da verilmiştir.

pH parametresi için sürdürülen bu analiz sonucunda, ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin en yüksek aktiviteyi Na-fosfat tamponun kullanıldığı pH 7 değerinde gösterdiği belirlenmiştir. Farklı tamponların kullanıldığı analizlere dayanarak, enzimin pH 2.4-2.8 aralığında ortalama %21.9 aktivite gösterdiği, pH 3.0-5.8 aralığında ise ortalamanın %64.8'e kadar yükseldiği saptanmıştır. Aktivite analizlerinin sürdürüldüğü pH değerinin nötrale yaklaşmasıyla (6.2-6.6), enzimin ortalama aktivitesinin %84.9'a kadar arttığı ve pH 7'de en yüksek düzeye vararak %100 aktiviteye ulaştığı gözlenmiştir. İncelenen pH değerlerinin artmasıyla birlikte ortalama enzim aktivitesinde azalma kaydedilmiştir. Buna göre pH 7.4-9.0 aralığında, ortalama aktivitenin %66.9'a

kadar düştüğü, pH 9.4-10.6 aralığında ise ortalamanın %38'lere kadar azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 3.6. Ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin optimum pH'sı

Literatürde günümüze kadar, bakterilerden ve mantarlardan saflaştırılan kitin deasetilaz enzimine yönelik karakterizasyon çalışmaları sonucunda farklı veya aynı türler arasında dahi farklı optimal değerlerin elde edildiği gözlenmiştir. Ancak genel raporlar ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin optimum aktivitesini gösterdiği pH değerinin 7 ile 12 arasında, intraselüler kitin deasetilazın ise 4.5-6 arasında olduğuna işaret etmektedir (Zhao ve ark., 2010). Çalışmamızda *Bacillus cereus*'dan elde edilen ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin en yüksek aktivitesini gösterdiği pH değerinin 7 olması sonuçlarımızın literatür bilgisi ile doğrulandığına işaret etmektedir.

Raval ve ark. (2013) *Bacillus cereus*'dan izole ettikleri kitin deasetilaz enzimini *E. coli* pLysS alıcı hücrelerine vektör aracılığıyla aktarmışlardır. Aktarılan genin son ürünü olan enzimin saflaştırılmasını takiben yapılan karakterizasyon çalışmaları neticesinde enzimin en yüksek aktivitesini gösterdiği pH değeri 7 olarak belirlenmiştir.

Toharisman ve Suhartono (2008) tarafından yapılan diğer bir *Bacillus* türü *Bacillus thermoleovorans* LW-4-11 suşundan elde edilen termostabil kitin deasetilazın en yüksek aktivitesini pH 6'da göstermesine karşın, termal stabilite çalışmalarını pH 7.0'deki sodyum tetraborat tamponunu kullanarak belirlemişlerdir.

*Bacillus* sp PT2-3 suşundan kısmi saflaştırılan kitin deasetilaz enziminin en yüksek spesifik aktivitesini pH 8’de gösterdiği, *Bacillus amyloliquefaciens*’dan CDA üretiminin araştırıldığı çalışmada ise pH 6’da en yüksek enzim üretimi, *Saccharomyces cerevisiae* CDA2 geninin *E. coli*’ye aktarıldığı diğer bir çalışmada ise bakteriden saflaştırılan kitin deasetilazın optimum aktivite gösterdiği pH değeri 8 olarak saptanmıştır (Martinou ve ark., 2003; Setyahadi ve ark., 2006; Zhou ve ark., 2010).

*Alcaligenes* sp. ATCC 55938 suşundan kısmi olarak saflaştırılmış bakteriyel kitin deasetilazın kinetik analizler sonucunda optimal pH değeri 6 olarak saptanmıştır (ElMekawy ve ark., 2013).

Li ve ark. (2007) deniz bakterisi *Vibrio cholerae*’dan saflaştırdıkları kitin oligosakkarit deasetilaz enziminin en yüksek aktivitesini gösterdiği optimal pH değerinin 7-7.5 olarak saptarken, denizel çevrenin ortalama pH değeri 8’de de enzimin aktivitesinin %90’dan fazlasını koruduğunu bildirmişlerdir.

Her ne kadar biyoteknolojik uygulamalarda kısa sürede en yüksek verimde ürün elde etmenin gerekliliği bilim adamlarını bakteriler ile çalışmaya yönlendirse de, mantarlar ile yapılan çalışmalarda akademik açıdan önem arz etmektedir. Bu nedenle bu enzimin kaynağı olarak *Bacillus cereus* çalışılmış olsa da tezimizin tartışma kısmında mantarlar ile ilgili çalışmalara da yer verilmiştir.

Mantarlar üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmalarında tezimizin sonuçlarına benzer şekilde *Aspergillus nidulans*, *Flammulina velutipes*, *Mucor racemosus*, ve *Rhizopus nigricans*’ın en yüksek aktivitelerini pH’sı 7’e ayarlanmış tampon sisteminde gösterdikleri ortaya konmuştur (Ghormade ve ark., 2010). Cai ve ark. (2013) *Scopulariopsis brevicaulis* küfünden saflaştırılan kitin deasetilaz enziminin de optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 7 olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlara karşın asidik ve bazik pH değerlerinde de optimum aktivite gösteren kitin deasetilaz enzimleri mantarlardan saflaştırılmıştır. *Absidia coerulea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. bertholletiae*, *Metarhizium anisopliae*, *Mortierella* sp, *Mucor rouxii*, *Rhizopus circinans* ve *Saccharomyces cerevisiae* türlerinin sırasıyla 5.0, 11.5, 4.5, 8.5, 5.5, 4.5, 5.5-6.0 ve 8.0 pH değerlerinde en yüksek aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Ghormade ve ark., 2010).

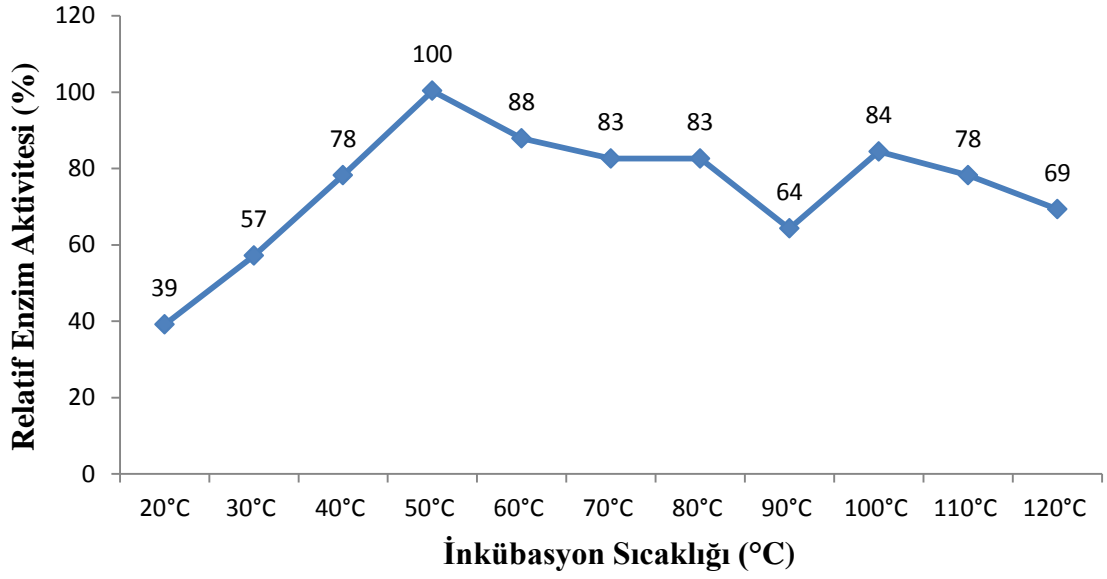
### 3.6. *Bacillus cereus*'un CDA Enziminin Optimum Sıcaklık Aralığı

*Bacillus cereus*'dan kısmi olarak saflaştırılan ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın belirlenmesi için, optimum aktivite gözlenen pH 7 Na-fosfat tamponunda hazırlanmış substrat çözeltisi kullanılarak, aktivite analizleri 20-120°C sıcaklık aralığında sürdürülmüştür. Elde edilen relatif enzim aktivite (%) sonuçları Şekil 3.7'de grafiğe edilmiştir.

Bu değerlere göre, *Bacillus cereus* ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 50°C olarak belirlenmiştir. Kitin deasetilaz enzime yönelik literatür incelemeleri çalışmamızın bulgularını destekler nitelikte, bu enzimin optimal sıcaklık değerinin 50 ve 60°C olduğunu bildirmektedir (Zhau ve ark., 2010). En yüksek aktivitenin (%100) gözlendiği 50°C sıcaklık değerini, %88 aktivitenin korunduğu 60°C'nin takip ettiği gözlenmektedir.

20-40°C sıcaklık aralığında hesaplanan ortalama aktivite %58.18 iken, bu sıcaklıkları takiben 60-120°C aralığındaki sıcaklıklarda sürdürülen analizlerde, ortalama %78.50 aktivite ortaya konmuştur. Tüm sıcaklık değerleri incelendiğinde ise, ortalama %74.9 aktivite elde edilmiştir.

Bu sonuçlar dikkate alındığında, saflaştırılan kitin deasetilaz enziminin incelenen sıcaklık değerlerinde kaydedeğer bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda aktivitenin gözlenmesine karşın, termal stabilite optimum aktivitenin kaydedildiği 50°C'de sürdürülmüştür.



Şekil 3.7. Ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin optimum sıcaklığı

ElMekawy ve ark. (2013) *Alcaligenes* sp. ATCC 55938 suşundan saflaştırılan CDA enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığı 35°C olarak tespit ederken, Martinou ve ark. (2003) *Escherichia coli*'de ekspresyonu gerçekleştirilen enzimin optimum aktivite sıcaklığını 50°C olarak saptamışlardır.

Termofilik karakterde *Bacillus thermoleovorans* LW-4-11 suşundan saflaştırılan kitin deasetilaz enziminin optimum sıcaklığı 80°C olarak ortaya konmuştur (Toharisman ve Suhartono, 2008). Çalışmamızda saflaştırılan enzimin mezofilik özellik taşıyan *Bacillus* suşundan saflaştırılmasına karşın 80°C sıcaklıkta aktivitesini %83 koruduğu gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise *Bacillus* PT2-3 suşundan elde edilen CDA enziminin en yüksek spesifik aktivitesi 60°C sıcaklıkta kaydedilmiştir (Setyahadi ve ark., 2006). SN-1 maya izolatının en yüksek aktivite gösteren kitin deasetilaz enzimini 35°C'lik inkübasyon sıcaklığında ürettikleri Kashyap ve Garg (2014) tarafından belirlenmiştir. *Vibrio cholerae* üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise kitin oligosakkarit deasetilazın en yüksek aktivite gösterdiği optimal sıcaklığın 45°C olmasına karşın, 37°C sıcaklıkta enzimin aktivitesini %75 koruduğu saptanmıştır (Li ve ark., 2007).

Kafetzopoulos ve ark. (1993) *Mucor rouxii* mantarından saflaştırdıkları kitin deasetilazın, substrat olarak glikol kitini kullandıkları karakterizasyon çalışmaları

sonucunda enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı 50°C olarak saptamışlardır. Diğer bir toprak izolatu mantar *Mortierella* sp. DY-52'den kitin deasetilaz saflaştırma çalışmalarında, Kim ve ark. (2008) enzimin optimum aktivite sıcaklığını 60°C olarak belirlemişlerdir. *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans*, *Benjaminiella poitrasii*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. bertholletiae* ve *Saccharomyces cerevisiae* türlerinden elde edilen fungal kitin deasetilazların en yüksek aktivitelerini gösterdiği sıcaklık değerleri çalışmamızı destekler nitelikte 50°C olarak belirlenmiştir (Ghormade ve ark., 2010).

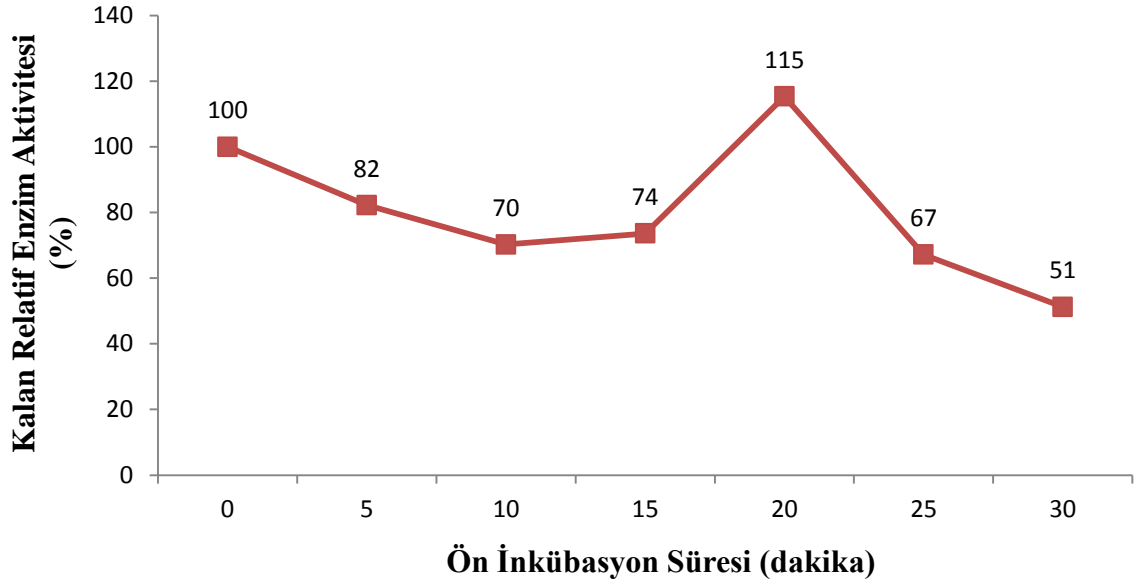
### **3.7. *Bacillus cereus*'un CDA Enziminin Termal Stabilitesine Ait Bulgular**

*Bacillus cereus*'dan elde edilen ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin aktivitesini koruduğu termal stabilitenin belirlenmesi için, enzim 50°C'de 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika ön inkübasyona tabii tutularak optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerinde hazırlanmış substrat çözeltisi ile aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre elde edilen sonuçlar kalan relatif enzim aktivitesi olarak Şekil 3.8'de gösterilmiştir.

Enzimin ilk 5 dakikalık ön inkübasyonu takiben aktivitesinde %18'lik bir azalma gözlenirken, inkübasyon süresinin artmasını takiben sırasıyla 10 ve 15 dakikalık ön inkübasyonla aktivitede %30 ve 26 oranlarında azalışlar kaydedilmiştir. Ancak ilk 15 dakikalık ön inkübasyon sürecinde enzimin ortalama %75.38 oranında orijinal aktivitesini koruduğu saptanmıştır.

Buna karşın 20 dakikalık ön inkübasyona maruz bırakılan enzimin aktivitesinde %41.73'lük bir artış gözlenmiş ve bu süreçte aktivite %115'e kadar yükselmiştir. 25 ve 30 dakikalık ön inkübasyon sonunda ise enzim aktivitesinde sırasıyla %48.17 ve 64.13'lük bir azalma kaydedilmiş olup, 30 dakikalık ön inkübasyon sonunda ortalama %76.66 oranında orijinal aktivitenin korunduğu ortaya konmuştur.





**Şekil 3.8.** Ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin termal stabilitesi

Setyahadi ve ark. (2006) *Bacillus* PT2-3 suşundan izole edilen kitin deasetilaz enziminin en yüksek aktivitesini gösterdiği optimal sıcaklık 60°C’de 0-180 dakika ön inkübasyonu sonucu, 60°C’de 30 ve 60 dakika ön inkübasyon analizinde enzimin nispeten stabilitesini koruduğu ancak inkübasyon süresinin 90 dakikaya uzatılmasıyla aktivitede %15.05’lik azalma ortaya konmuştur.

*Bacillus thermoleovorans* LW-4-11 suşundan kısmi saflaştırılan kitin deasetilaz enziminin termal stabilite çalışmaları 70°C, 80°C, 90°C ve 100°C sıcaklıklarda 0-60 dakika arasında ön inkübasyonu sonucun enzimin, 70°C’de 45 dakika ön inkübasyonu takiben %50’den fazla stabilitesini korurken, 1 saatte tamamen aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. 80°C’de 30 inkübasyonu takiben enzimin aktivitesinin %50’sini 1 saat sonra ise %80’nini kaybettiği ortaya konmuştur. 90°C ve 100°C sıcaklıklar için ise sırasıyla 40 ve 5 dakika ön inkübasyon sonrası orjinal enzimin aktivitesinin hemen hemen %50’sini kaybettiği saptanmıştır (Toharisman ve Suhartono, 2008).

*Vibrio cholerae*’dan elde edilen kitin oligosakkarit deasetilaz enziminin termal stabilite çalışmaları işaret edilen sıcaklıklarda enzimin 30 dakika ön inkübasyona tabii tutulmasıyla gerçekleştirilmiştir. Enzimin 50°C ve üzerindeki sıcaklıklarda stabilitesini koruduğu ancak 60°C’de 30 dakika inkübasyon sonrası hemen hemen aktivitesinin tümünü kaybettiği saptanmıştır (Li ve ark., 2007).

Martinou ve ark. (2002) *Saccharomyces cerevisiae*'den saflaştırdıkları kobalt aktive kitin deasetilaz enziminin 50°C sıcaklıkta 24 saatlik ön inkübasyon sonrası enzimin stabilitesini %60 düzeyinde koruduğu ortaya konmuştur.

*Mortierella* sp. DY-52 suşundan saflaştırılan ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin termal stabilitesi 20-70°C sıcaklıklar arasında substrat olmaksızın enzimin 1 saatlik ön inkübasyonu ile belirlenmiştir. Kim ve ark. (2008)'e göre bu enzimin optimal sıcaklığının 60°C olarak bulunmasına karşın enzimin 40°C altındaki sıcaklıklarda stabilitesini korurken 60°C üzerindeki sıcaklıklarda stabilitesini tamamen kaybettiği saptanmıştır.

Gao ve ark. (1995) *Absidia coerulea*'dan saflaştırdıkları kitin deasetilazın 50°C'de 1 saatlik ön inkübasyonu sonucu bile aktivitesini %100 koruduğunu belirlemişlerdir. Tsigos ve Bouriotis (1995) tarafından *Colletotrichum lindemuthianum*'dan kitin deasetilazın karakterizasyon çalışmalarında 37°C, 50°C ve 60°C sıcaklıklarda 0-50 saat arasında ön inkübasyon ile termal stabilite analiz edilmiştir. Enzimin 50°C'de 45 saatlik ön inkübasyonunda dahi aktivitesinde herhangi bir azalma gözlenmemiştir.

### **3.8. *Bacillus cereus*'un CDA Enzimi Üzerine Kimyasalların Etkisi**

*Bacillus cereus*'dan elde edilen ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin aktivitesi üzerine, kimyasal maddelerin etkisini saptamak amacıyla, son konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde hazırlanmış enzim-kimyasal madde karışımı 37°C'de 1 saat ön inkübasyonu takiben optimum koşullarda aktivite analizleri sürdürülmüştür. Ve elde edilen veriler arta kalan relatif aktivite cinsinden Çizelge 3.3'de verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Kitin deasetilaz enzimi üzerine inhibitörlerin, deterjanların ve metal iyonların etkisi

	<b>Kalan Relatif Aktivite (%)</b>
<b>Kimyasallar</b>	<b>5 mM Konsantrasyon</b>
CoCl <sub>2</sub>	<b>113</b>
EDTA	19
SDS	97
Triton X-100	24
2-merkaptoetanol	89
MgCl <sub>2</sub>	64
NaCl	<b>137</b>
CaCl <sub>2</sub>	<b>102</b>
MnCl <sub>2</sub>	83
Gliserol	<b>123</b>
Asetik asit	<b>105</b>

Enzim-kimyasal karışımının ön inkübasyonu sonucunda CoCl<sub>2</sub>, SDS, 2-merkaptoetanol, MgCl<sub>2</sub> ve MnCl<sub>2</sub> varlığında enzimin sırasıyla %113, 97, 89, 64 ve 83 oranında aktivitesini koruduğu saptanmıştır. Ancak EDTA ve Triton X-100 ile sürdürülen analizlerde ise diğer kimyasallara kıyasla enzimin %81.12 ve 75.55 oranında enzimin aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. Bu kimyasalların varlığında enzim aktivitesinin inhibe olduğu ortaya konmuştur. Buna karşın NaCl, CaCl<sub>2</sub>, gliserol ve asetik asit kimyasalları ile yapılan ön inkübasyon sonucu sırasıyla enzim aktivitesinin %37, 2, 23 ve 5 oranında stimule edildiği gözlenmiştir. Bütün kimyasallar maddelere yönelik kalan aktivite dikkate alındığında, enzim aktivitesini ortalama %84.98 oranında korurken, %15.02 düzeyinde ise aktivitenin inhibe olduğu gösterilmiştir.

*Bacillus cereus*'dan elde edilip *E. coli*'de ekspre edilen rekombinant kitin deasetilaz enziminin Co<sup>+2</sup> yokluğunda inaktif iken Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> metal iyonlarının varlığında aktivitenin etkilenmediği ancak Cu<sup>+2</sup> varlığında enzimin aktivitesini negatif etkilendiği belirlenmiştir (Raval ve ark., 2013).

*Bacillus thermoleovorans* LW-4-11'dan kitin deasetilazın 1 mM konsantrasyonda EDTA varlığında aktivitesinin yaklaşık %50 arttığı ancak aynı konsantrasyonda Mn<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Li<sup>+1</sup> ve Ni<sup>+1</sup> metal iyonları ile aktivite inhibe olurken, Zn<sup>+2</sup> ve Ni<sup>+1</sup> inkübasyonunda aktivitenin %85'inden fazlasının kaybedildiği ortaya konmuştur (Toharisman ve Suhartono, 2008).

*Bacillus* sp. PT2-3 suşundan saflaştırılan kitin deasetilaz spesifik aktivitesinin, 5 mM  $Zn^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  varlığında sırasıyla %4.39 ve 7.8 arttığı,  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  ve  $Fe^{+2}$  varlığında ise sırasıyla %46.83, 41.22 ve 47.32 oranında azaldığı Setyahadi ve ark. (2006) tarafından tespit edilmiştir.

*Bacillus amyloliquefaciens* Z7 suşundan yüzey tepki yöntemi ile He ve ark. (2014)'nın kitin deasetilaz üretimi çalışmaları araştırmada ortama  $MgSO_4$  0.19 g/L,  $K_2HPO_4$  0.3 g/L ve NaCl 5 g/L eklenerek total enzim kazancının %46.6 arttığı saptanmıştır.

Li ve ark. (2007) *Vibrio cholerae*'den elde edilen kitin oligosakkarit deasetilaz enzim aktivitesinin metal iyonlara karşı hassas olduğunu belirlemiş olup 2 mM konsantrasyonda  $Ag^{+1}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  varlığında inhibisyon ancak 1 mM DTT ve 5 mM EDTA varlığında aktivitede çok düşük bir etki gözlemlenmiştir.

*Escherichia coli*'den saflaştırılan rekombinant kobalt bağımlı kitin deasetilazın aktivite stabilitesi için 1 mM  $Co^{+2}$  gerekli olduğu ancak  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  gibi diğer metal iyonlarının benzer bir etki göstermeyerek inhibitör olarak davrandığı ortaya konmuştur (Martinou ve ark., 2003).

Martinou ve ark. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* kökenli kitin deasetilaz enziminin aktivitesini EDTA ve  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  metal iyonlarının 1-100 mM konsantrasyonda inhibe ettiğini ancak 1 mM  $Co^{+2}$  iyonunun orijinal aktiviteyi %60 arttırdığını rapor etmişlerdir.

Kafetzopoulos ve ark. (1993) *Mucor rouxii*'den elde ettikleri kitin deasetilaz enziminin 1-10 mM konsantrasyonda klorid olarak test ettikleri  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  metal iyonları ile EDTA'nın etkisi incelendiğinde enzimin aktivite için herhangi bir metal iyonuna gereksinim duymadığı gözlemlenmiştir.

$Hg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ , EDTA,  $Ag^{+1}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  ve  $Sn^{+2}$  gibi kimyasalların konsantrasyona (1-10 mM) bağlı olarak *Mortierella* sp. DY-52 suşuna ait CDA enzimi aktivitesi üzerinde inhibitör etki gösterdiği ancak  $Ca^{+2}$  (% 93 ve 126) ve  $Co^{+2}$  (%146-160) iyonunun aktivatör olarak davrandığı belirlenmiştir (Kim ve ark., 2008).

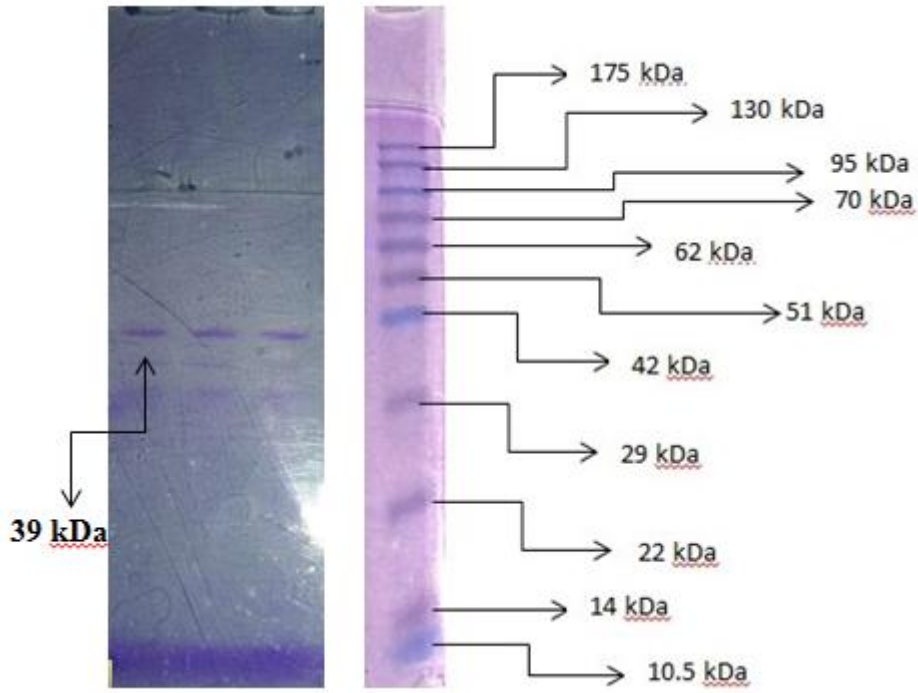
Tsigos ve Bouriotis (1995) *Colletotrichum lindemuthianum* kitin deasetilazının aktivitesini  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  metal iyonları inhibe ederken,  $Na^{+1}$ ,  $K^{+1}$ ,  $Li^{+1}$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  iyonlarının aktiviteyi inhibe etmediği  $Co^{+2}$ 'nin aktiviteyi 3 kat kadar arttırdığı saptanmıştır.

*S. brevicaulis*'in kitin deasetilaz üretim ortamı optimizasyonuna yönelik metal iyonlarının etkisinin araştırıldığı analizde, kültüre %0.05  $MnSO_4$  veya %0.03  $CoCl_2$  veya %0.05  $MgSO_4$  eklendiği enzim üretim kapasitesinde sırasıyla %76, %70 ve %68 artma gözlenmiştir. Besi ortamına  $Fe^{+3}$ ,  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  eklendiğinde üretimin inhibe olduğu belirlenmiştir (Cai ve ark., 2013).

Gao ve ark. (1995) tarafından *Absidia coerulea*'dan saflaştırılan kitin deasetilazın 1 ve 10 mM konsantrasyonda EDTA ve  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  varlığında enzim inhibe olmazken  $Fe^{+3}$ 'ün 1 Mm konsantrasyonunda bile inaktive olduğu saptanmıştır.

### **3.9. CDA Enziminin Moleküler Ağırlığının Tespiti**

*Bacillus cereus*'dan kısmi olarak saflaştırılan ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin moleküler ağırlığı %12'lik homojen SDS-PAGE sistemi kullanılarak belirlenmiş olup enzime ilişkin protein bandı Şekil 3.9'da gösterilmiştir. CDA enzimine ait 39 kDa moleküler ağırlığında tek protein bandı elde edilmiştir.



**Şekil 3.9.** CDA enzimine ait SDS-PAGE bulguları (Soldan sağa üç kuyucuğada kitin deasetilaz örneğinin yüklendiği SDS-PAGE bulguları; protein markırın SDS-PAGE bulguları)

Raval ve ark. (2013) tarafından yapılan kitin deasetilazın klonlama çalışmaları sonucunda saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığını SDS-PGE analizleri ile belirlemiş olup 32 kDa ve 30 kDa olarak iki protein bandı tespit etmişlerdir.

Martinou ve ark. (2003) *E. coli*'den saflaştırılan rekombinant enzimi monomer olarak tanımlamış olup proteinin ortalama moleküler ağırlığını 35 kDa olarak saptamışlardır. Metilotrofik bir maya türü olan *Pichia pastoris* GS115 saflaştırılmış diğer bir rekombinant kitin deasetilaz enzimi için ortalama moleküler ağırlık 33 kDa olarak hesaplanmıştır (Lixin ve ark., 2012). *Aspergillus nidulans*'dan saflştırılıp *Escherichia coli*'ye aktarılan kitin deasetilaz enziminin önceki moleküler ağırlığı 19.5 kDa iken, klonlama ve ekspresyon sonraki ağırlığı 24.2 kDa olarak belirlenmiştir (Wang ve ark., 2010).

*Uromyces viciae-fabae*'den saflaştırılan kitin deasetilaz enziminin ortalama moleküler ağırlığı 12.7 ve 48.1 kDa arasında değişen beş izoenzimi, moleküler ağırlıkları 26-65 kDa arasında farklılık gösteren *R. nigricans*'da dört; *M. racemosus*'da ise üç izoenzim rapor edilmiştir (Ghormade ve ark., 2010). *C. lindemuthianum*'dan saflaştırdıkları kitin

deasetilaz enzimine yönelik 31.5 ve 33 kDa ağırlığında iki aktif protein bandı belirlemişlerdir (Tokuyasu ve ark., 1996). Farklı bir mantar türü *M. rouxii* CDA'sının moleküler ağırlığı ise 75 kDa olarak ortaya konmuştur (Kafetzopoulos ve ark., 1993).

Nadarajah ve ark. (2006) *Absidia butleri* dr fungal izolatından SDS-PAGE analizleri sonucunda moleküler ağırlığı oldukça yüksek kitin deasetilaz enzimine ait 97.6 ve 221.7 kDa ağırlığında iki protein bandı belirlemişlerdir.

#### 4. SONUÇ VE YORUM

Son birkaç yıldır, çeşitli ortam koşulları altında yüksek hız ve aktivitede reaksiyonları katalizleme yeteneklerinden dolayı biyokatalizörler (enzimler), eczacılıkta ve tarımda kompleks ilaç ara ürünlerin, özel kimyasalların ve hatta emtia kimyasalların sentezinde, gıda ve tekstil sektöründe, arıtım teknolojilerinde ve kök hücre tedavi yöntemleri gibi çeşitli alanlarda kimyasal katalizörlere daha yeşil bir alternatif olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Singh ve ark., 2013).

Çeşitli endüstrilerdeki enzim uygulamalarına olan ilginin artışı, yeni ve stabil biyokatalizörlerin üretimi için bitkisel, hayvansal dokular ve mikroorganizmalar gibi farklı biyolojik kaynakların kullanımına neden olmaktadır (Singh ve ark., 2013).

Çeşitli biyo-proseslerde uygulanabilir termostabil, yüksek sıcaklık toleranslı, asidik ve alkali koşullarda stabil ve çeşitli metallerin ve bileşiklerin varlığında aktivitesini koruma gibi spesifik karakterde enzim preparatlarının üretimi için son yıllarda mikrobiyal kaynaklı enzimlerin üretimine yön verilmiştir (Nigam, 2013).

$\beta$ -1,4-glikosidik bağ ile bağlanmış N-asetilglukozamin ve glukozaminin lineer bir kopolimeri olan kitosan, bazı mantarların hücre duvarlarında doğal olarak bulunmaktadır. Günümüze değin kitosanın ticari üretimi, böceklerin dış iskeleti, karides ve pavurya kabuğu ve mürekkep balığı atığından ekstre edilen kitinin kısmi kimyasal deasetilasyonu sonucu yapılmaktaydı (Raval et al., 2013). Yukarıda belirtilen kaynakların toplanması, deproteinizasyon, demineralizasyon, ağartma, deasetilasyon ve ortamdaki parçalanmayan kitin ve atıkların uzaklaştırılması gibi kimyasal prosesler sonucunda kitosan piyasaya sürülebilir forma dönüştürülmektedir.

Bu gibi olumsuzluklardan dolayı, son zamanlarda polikasyonik özelliği başta olmak üzere düşük toksisite, biyoyumluluk, antimikrobiyal ve biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi özellikleri sayesinde gıdadan sağlığa, tarımdan tekstile kadar çok



geniş bir perspektifte kullanım alanına sahip ve parçalanarak tekrar doğa tarafından emilimi mümkün kitosanın, üretim süreçlerindeki kimyasal proseslerin asgari düzeye indirgenmesini mümkün kılan bakteriyel ve fungal kökenli kitin deasetilaz enzimleri kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Karataş ve Mersin sahillerinden alınan toprak örneklerinden izole edilmiş *Bacillus cereus* suşundan ekstraselüler kitin deasetilaz üretimi ve bu enzimin endüstriyel kullanımına yönelik karakterizasyon analizleri yapılmıştır.

Toprak örneğinden koloidal kitin içeren katı besiyerinde kitinolitik aktivite gösteren 3 adet suş izole edilmiş olup, suşların kitinin kitosana biyodönüşümünü katalizleyen kitin deasetilaz enzim üretimine yönelik tarama sonucunda sadece 2 nolu suşun CDA üreticisi olduğu saptanmıştır. 2 nolu suş Gr boyama ve VITEK identifikasyon sistem analizi ile *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır.

Sıvı fermantasyon ortamında geliştirilen *Bacillus cereus* kültüründen santrifujleme ve alkol presipitasyonu sonucu elde edilen enzim preparatlarının spesifik aktiviteleri sırasıyla 0,274 ve 0,028 U/mg olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Karakterizasyon çalışmalarına, yüksek aktivite gözlenen ham enzim preparatı ile devam edilmiştir.

Farklı pH aralıklarında yapılan enzim aktivite analizlerinde enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri 7 olarak ortaya konmuştur. Enzimin 2.4, 2.8, 3.0, 3.4, 3.8, 4.2, 4.6, 5.0, 5.4, 5.8, 6.2, 6.6, 7.4, 7.8, 8.2, 8.6, 9.0, 9.4, 9.8, 10.2 ve 10.6 pH değerlerinde sırasıyla %11, %33, %46, %41, %66, %63, %73, %68, %82, %80, %90, %80, %76, %63, %68, %72, %55, %60, %41, %28 ve %22 aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.6). pH 2.4-2.8 aralığında %21.9 olarak belirlenen ortalama enzim aktivitesinin pH 3.0-5.8 aralığında %64.8'e arttığı ve analizlerin sürdürüldüğü pH değerinin nötrale yaklaşmasıyla bu artışın %84.9'a ulaştığı saptanmıştır. Ortalama enzim aktivitesinin pH 7.4-9.0 ve 9.4-10.6 aralığında sırasıyla %66.9 ve %38'e kadar azaldığı gözlenmiştir.

Ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin 50°C sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiği belirlenmiş olup incelenen 20°C, 30°C, 40°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C, 110°C ve 120°C sıcaklıklardaki relatif enzim aktivitesi sırasıyla %39, %57, %78, %88, %83, %83, %64, %84, %78 ve %69 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.7). 20-40°C sıcaklık

aralığında hesaplanan ortalama aktivite %58.18 iken 60-120°C aralığında ise %78.50'e kadar artış gözlenmiştir. Enzimin en yüksek aktivitesini gösterdiği 50°C sıcaklığı takiben artan sıcaklıklarda da stabil olmamak kaydıyla aktivitenin devam ettiği saptanmıştır. Bu sonuçlar saflaştırılan bu enzimin yüksek sıcaklık uygulamaları içeren endüstriyel uygulamalarda kullanılabilceğini göstermektedir.

Ekstraselüler kitin deasetilaz enziminin termal stabilitenin belirlenmesi için, enzim 50°C'de 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika ön inkübasyona tabii tutulmuştur. Bu süreçlerde enzimin koruduğu relatif aktivitesi sırasıyla %82, %70, %74, %115, %67 ve %51 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.8) Enzimin en yüksek aktivitesini gösterdiği optimum sıcaklıkta 20 dakika ön inkübasyonu takiben aktivitenin %115 ile en yüksek değere ulaştığı ortaya konmuştur.

5 mM konsantrasyonda inhibitörlerin, deterjanların ve metal iyonların enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin incelendiğinde asetik asit, gliserol, CoCl<sub>2</sub>, NaCl ve CaCl<sub>2</sub>'ün varlığında enzimin aktivitesini sırasıyla %5, %23, %13, %37 ve %2 oranında arttırdığı belirlenmiştir (Çizelge 3.3). EDTA ve TritonX-100 varlığında ise enzimin %81.12 ve %75.5 düzeyinde aktivitesini kaybettiği saptanmıştır. En güçlü inhibitörün EDTA olduğu gözlenmiştir. SDS, 2-merkaptetanol, MgCl<sub>2</sub> ve MnCl<sub>2</sub> içeren tamponlarda ise enzimin aktivitesini %97, %89, %64 ve %83 oranında koruduğu ortaya konmuştur.

SDS-PAGE analizleri sonucunda *Bacillus cereus*'dan kısmi saflaştırılmış kitin deasetilaz enzimine ait 39 kDa moleküler ağırlığında tek protein bandı elde edilmiştir (Şekil 3.9).

Kitinin hidrolize ürünü kitosanın materyal bilimi, tıp, gıda katkı maddesi, kozmetik ve eczacılık gibi pek çok endüstriyel alanda kullanılabilirliği, bu biyopolimere yönelik üretim proseslerine olan ilginin gün geçtikçe artmasına neden olmaktadır. Kimyasal prosedürlerle karşılaştırıldığına, kitosan polimer ve oligomerlerin üretimi ile sonuçlanan bu biyodönüşüm reaksiyonunda, CDA kullanımının kolaylıkla kontrol edilebilirliği ve çevre dostu bir proses olması enzimin endüstriyel kullanımını da arttırmaktadır. CDA'nın endüstriyel uygulanabilirliği, ancak güçlü CDA üreticilerinin taranması ve ekspresyon seviyesinin artırılması ile mümkün olacaktır. Çünkü CDA enziminin pek çok mantar, böcek ve deniz bakteri türlerinde mevcut olmasının karşın, diğer türlerdeki

düşük içeriği enzim aktivitesinde azalma ile sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla çalışmamız yeni bir CDA üreticisi suşun literatüre kazandırılması konusunda öncü bir tez niteliği taşımakla birlikte enzimin ekspresyon seviyesinin arttırılması gibi ileri ki çalışmalara yön vererek, endüstriyel kullanımı mümkün kılacaktır.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Akan, S., “Keratalitik *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu, Keratinaz Üretimi ve Karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
- [2] Atasagünil. M., 1965. Enzimler, Güzel İstanbul Matbaası, ISBN: 574-192-5, Ankara, s.5-6.
- [3] Boyce, S., Tipton, K. F., 2001. Enzyme Classification and Nomenclature, Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group, Chichester, s.1-11.
- [4] Cai, J., Li, J., Wang, C., Lin, J., Hu, Y., Yang, J., Du, Y., Zheng, H., 2013. Parametric Optimization of Extracellular Chitin Deacetylase Production by *Scopulariopsis brevicaulis*. Journal of Biocatalysis & Biotransformation 2(1), 1-5.
- [5] Christakopoulos, P., Topakas, E., 2012. Advances in Enzymology and Enzyme Engineering. CSJB 2(3), 1.
- [6] Cuesto, S. M., “The Chemistry and Evolution of Enzyme Function: Isomerases as a Case Study”, PhD Thesis, University of Cambridge, European Bioinformatics Institute, 2014.
- [7] De Britto D., Goy R. C., Filho S. P. C., Assis O. B. G., 2011. Quaternary Salts of Chitosan: History, Antimicrobial Features, and Prospects. International Journal of Carbohydrate Chemistry 2011, 1-12.
- [8] Demir, A., Seventekin, N., 2009. Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları. Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi 3(2), 92-103.
- [9] Dixit, R., Arakane, Y., Specht, C. A., Richard, C., Kramer, K. J., Beeman, R. W. Muthukrishnan, S., 2008. Domain Organization and Phylogenetic Analysis of Proteins From the Chitin Deacetylase Gene Family of *Tribolium castaneum* and Three Other Species of Insects. Insect Biochemistry and Molecular Biology 38, 440-451.
- [10] Dutta, P. K., Dutta, J. Tripathi, V S., 2004. Chitin and Chitosan: Chemistry, Properteis and Applications. Journal of Scientific & Industrial Research, 63, 20-31.
- [11] ElMekawy, A., Hegab, H. M., El-Baz, A., Hudson S. M., 2013. Kinetic Properties and Role of Bacterial Chitin Deacetylase in the Bioconversion of Chitin to Chitosan. Recent Pat Biotechnol. 7(3), 234-241.
- [12] Eltaib, F. I., “Partial Purification and Characterization of Chitin Deacetylase From *Mucor rouxii*”, Master's Thesis, McGill University, Food Science & Agricultural Chemistry Department Macdonald Campus, 1999.
- [13] Gao, X. D., Katsumoto, T., Onodera, K., 1995. Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Absidia coerulea*. J. Biochem. 117, 257-263.

- [14] Ghormade, V., Kulkarni, S., Doiphode, N., Rajamohanan, P. R., Deshpande, M. V., 2010. Chitin deacetylase: A comprehensive account on its role in nature and its biotechnological applications. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology 1054-1066.
- [15] Goy, R. C., Britto, D., Assis, O. B. G., 2009. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Ciência e Tecnologia*, 19, 241-47.
- [16] Gökçe, Y., “Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi”, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
- [17] He, Y., Xu, J., Wang, S., Zhou, G., Liu, J., 2013. Optimization of medium components for production of chitin deacetylase by *Bacillus amyloliquefaciens* Z7, using response surface methodology. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 28(2), 242-247.
- [18] Horwood, P. F., “Detection and Further Characterisation of the Toxins and Associated Genes of *Bacillus cereus*”, PhD Thesis, James Cook University, Microbiology and Immunology, 2005.
- [19] Ischaidar, Natsir, H., Dali, S., 2014. Production and Application of Chitin Deacetylase from *Bacillus licheniformis* HSA3-1a as Biotermicide. *Marina Chimica Acta*. 15(1), 8-12.
- [20] Jeraj, N., Kunic, B., Lenasi, H., Breskvar, K., 2006. Purification and Molecular Characterization of Chitin Deacetylase from *Rhizopus nigricans*. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1294-1299.
- [21] Jiang L., “Comparison Of Disk Diffusion, Agar Dilution, And Broth Microdilution For Antimicrobial Susceptibility Testing Of Five Chitosans”. Master Thesis, Louisiana State University, 2011.
- [22] Kafetzopoulos, D., Martinou, A., Bouriotis, V., 1993. Bioconversion of Chitin to Chitosan: Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2564-2568.
- [23] Kalkan, S., “Çiğ Sütte *Bacillus cereus* Sayılması İçin Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar”. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006.
- [24] Kashyap, S. R., Garg, N., 2014. Isolation, Production, Quantitative assay and Optimization of Chitin deacetylase from Yeast. *Scholars Academic Journal of Biosciences* 2(1), 43-47.
- [25] Kayalı, E., Beyathlı Y., 2003. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA 'ları. *Mikrobiyoloji Dergisi* 1(12), 24-35.

- [26] Kaur, K., Dattajirao, V., Shrivastava, V., Bhardwaj, U., 2012. Isolation and Characterization of Chitosan-Producing Bacteria from Beaches of Chennai, India. *Enzyme Research* 2012, 1-6.
- [27] Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U., Nursel Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi* 9(1), 1-8.
- [28] Kim, Young-Ju, Zhao, Y., Oh K. T., Nguyen, V. N., Park, R. D., 2008. Enzymatic Deacetylation of Chitin by Extracellular Chitin Deacetylase from a Newly Screened *Mortierella* sp. DY-52. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(4), 759-766.
- [29] Kirk, O., Borchert T. V., Fuglsang, C. C., 2002. Industrial Enzyme Applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 345–351.
- [30] Kumirska, J., Weinhold, X. M., Thoming, J., Stepnowski, P., 2011. Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of *N*-Acetylation. *Polymers* 3, 1875-1901.
- [31] Kuzu, S. B., “Kitinaz Üreten *Bacillus* İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.
- [32] Lee, J. K., Sing, R., Tiwari, M.K. Sing, R. K., 2013. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 1232-1277.
- [33] Li, X., Wang, L. X., Wang, X., Roseman, S., 2007. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio cholerae*: Characterization of a unique chitin oligosaccharide deacetylase. *Glycobiology* 17(12), 1377-1387.
- [34] Lin, S., “Identification of Contamination Sources of *Bacillus cereus* in Pasteurized Milk”, Master’s Thesis, The University of Guelph, 1997.
- [35] Lixin, K., Xiaomei, C., Chao, Z., Lixin, M., 2012. Synthesis and High Expression of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris* GS115. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22(9), 1202-1207.
- [36] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farra, N. J., Randall, R. J., 1951. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275
- [37] Martinou, A., Koutsioulis, D., Bouriotis, V., 2002. Expression, Purification, and Characterization of a Cobalt-Activated Chitin Deacetylase (Cda2p) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification* 24, 111–116.
- [38] Martinou, A., Koutsioulis, D., Bouriotis, V., 2003. Cloning and expression of a chitin deacetylase gene (*CDA2*) from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*

Purification and characterization of the cobalt-dependent recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 32, 757-763.

[39] MEGEP, “Enzimlerin Özellikleri” Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Gıda Teknolojisi, 2007.

[40] Mojsov, K., 2011. Application of Enzymes in The Textile Industry: A Review. II International Congress “Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry” 230-239.

[41] Nadarajah, K., Lau, B. Y. C., Othman, O., Hasidah, M. S., Wan Mohtar, W. Y., 2006. Characterization of Chitin Deacetylase from Fungus *Absidia butleri* dr. *Malays Appl. Biol.* 35(2), 59-65.

[42] Nahar, P. B., “Development of Biocontrol Agents for the Control of Pests in Agriculture Using Chitin Metabolism as Target” PhD Thesis, The University of Pune, Philosophy in Microbiology, 2004.

[43] Nigam, P. S., 2013. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. *Biomolecules* 3, 597-611.

[44] Rauchhaus, F. U., “Untersuchungen zur Bedeutung der Chitindeacetylase 1 pathogener Hyphen von *Colletotrichum graminicola* (CES.) WILS. während der frühen Infektionsphasen” Master’s Thesis, zur Erlangung des akademischen Grades doktor rerum naturalium, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät, der Martin-Luther-Universität, 2002.

[45] Raval, R., Raval, K., Moerschbacher, B. M., 2013. Enzymatic Modification of Chitosan Using Chitin Deacetylase Isolated from *Bacillus cereus*. *Open Access Scientific Reports* 2(1), 1-4.

[46] Rochima, E., Afrianto, E., Juniaton, 2008. Production of Chitosan from Local Crab Chitin Waste Enzymatically for Health Drink. *Proceeding of The International Seminar on Chemistry* 305-310.

[47] Santos, M. J. “The Antimicrobial Effect of Red Wine on *Bacillus cereus* in Stimulated Gastrointestinal Conditions”, Master’s Thesis, Escola Superior de Biotecnologia of the Universidade Católica, Microbiology, 2010.

[48] Schulz, M. E., Svensson, B., Guinebretiere, M. H., Lindback, T., Andersson, M., Schulz, A., Fricker, M., Christiansson, A., Granum, P.E., Martlbauer, E., Nguyen-The, C., Salkinoja-Salonen, M., Scherer, S., 2005. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* 151, 183-197.

[49] Setyahadi, S., Bunasor, T. K., Hendarsyah, D., 2006. Characterization of Thermostable Chitin Deacetylase from Bacteria Strain Pancuran Tujuh, Baturaden, Center of Java. *Jurnal Teknol. Dan Industri Pangan* 17(1), 44-49.

[50] Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R., Lee, J. K., 2013. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 1232-1277.

[52] Temizkan, G., Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri, ISBN:975-420-347-4, İstanbul, s.315-320.

[53] Toharisman, A., Suhartono, M. T., 2008. Partial Purification and Characterization of Chitin Deacetylase Produced by *Bacillus thermoleovorans* LW-4-11. Scientific Repository, IPB Bogor Agricultural University.

[54] Tokuyasu, K., Onishi-Kameyama, M., dan Hayashi, K., 1996. Purification and Characterization of Extracellular Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(10), 1598-1603.

[55] Tsigos, I., Bouriotis, V., 1995. Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *The Journal of Biological Chemistry.* 270(44), 26286-26291.

[56] Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., Bouriotis, V., 2000. Chitin Deacetylases: New, Versatile Tools in Biotechnology. *Trends Biotechnology* 18(7), 305-312

[57] Underkofler, L. A., Barton, R. R., Rennert, S. S., 1957. Production of Microbial Enzymes and Their Applications. *Microbiological Process Report* 6, 212-221.

[58] Varesano, A., Vineis, C., Aluigi, A., Rombaldoni, F., 2011. Antimicrobial polymers for textile products, Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. *Formatex Research Center*, 99-110.

[59] Xavier K. A. M., "Standardization Of Optimum Conditions For The Production Of Glucosamine Hydrochloride From Chitin", PhD Thesis, Cochin University of Science and Technology, Central Institute of Fisheries Technology, 2006.

[60] Wang, Y., Song, J. Z., Yang, Q., Liu, Z. H., Huang, X. M., Chen, Y., 2010. Cloning of a heat-stable chitin deacetylase gene from *Aspergillus nidulans* and its functional expression in *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 843-854.

[61] Zhao, Y., Park, R. D., Muzzarelli, R. A. A, 2010. Chitin Deacetylases: Properties and Applications. *Marine Drugs* 8(1), 24-46.

[62] Zhou, G., Zhang, H., He, Y., He L., 2010. Identification of a chitin deacetylase producing bacteria isolated from soil and its fermentation optimization. *African Journal of Microbiology Research* 4(23), 2597-2603.

[www.worthington-biochem.com/introbiochem/enzymes.pdf](http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/enzymes.pdf)



## 6. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Ramazan KARAYILAN

**Doğum Yeri** : Birecik/ŞANLIURFA

**Doğum Tarihi** : 22.08.1987

**E posta** : delila6363@hotmail.com

**Yabancı Dili** : İngilizce, Türkçe

### **Eğitim Durumu**

**Orta Öğretim** : Şahinbey Atatürk Lisesi, 2006, GAZİANTEP

**Lisans** : Kilis 7 Aralık Üniversitesi Biyoloji Bölümü, 2012, Kilis  
2014 yılından itibaren TÜBİTAK'da bursiyer.

**Yüksek Lisans** : Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Kilis (Devam ediyor).