Exiguobacterium acetylicum'un BİYOKİMYASAL VE BAZI ENZİMATİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Emre CANCA

Yüksek Lisans Tezi

Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

2020

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Exiguobacterium acetylicum'un BİYOKİMYASAL VE BAZI ENZİMATİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

(Determination of Biochemical and Some Enzymatic Characteristics of *Exiguobacterium acetylicum*)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emre CANCA

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Erzurum

Ağustos, 2020

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Emre CANCA tarafından hazırlanan "***Exiguobacterium acetylicum'un BİYOKİMYASAL VE BAZI ENZİMATİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ***" başlıklı çalışması 28/08/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR *Atatürk Üniversitesi*	…….....
Danışman:	Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ *Atatürk Üniversitesi*	…….....
Jüri Üyesi:	Doç.Dr. Serkan ÖRTÜCÜ *Erzurum Teknik Üniversitesi*	…….....

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında sunulan "***Exiguobacterium acetylicum'un BİYOKİMYASAL VE BAZI ENZİMATİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ***" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	**13**	**30**
Kuramsal Temeller	**13**	**30**
Materyal ve Yöntem	**14**	**35**
Bulgular	**4**	**20**
Tartışma	**4**	**20**
Tezin Geneli	**19**	**25**

Not: *Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının* ***% 5'den*** *büyük olmaması gerekir.*

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	**Tez Danışmanı**
Emre CANCA	Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ
28.8.2020	**28.8.2020**
İmza:	İmza:

***** Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve ……. sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve ……. sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında ilgi ve alakalarını hiçbir zaman eksik etmeyen, fikir ve bilgileriyle yoluma her zaman ışık tutan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve çalışmamda yaşadığım zorlukları aşmamda bana olan destekleri sebebiyle danışmanım Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a,

Çalışmam sırasında Atatürk Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nün idari ve laboratuvarlar imkanlarını kullanmamda her türlü kolaylığı sağlayan bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ'a,

Laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında, takıldığım her konuda benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarıma kendi çalışmalarında gösterdikleri ilgi ve alakayı gösterip her zaman yanımda olan yüksek lisans arkadaşlarım Yüksek Lisans Öğrencisi Sevda UÇAR ve Yüksek Lisans Öğrencisi Şeyma ALIM'a

Laboratuvar imkanlarını kullanmamda bana her türlü kolaylığı sağlayan Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi(DAYTAM)'nin idari ve teknik kadrosuna,

Lisans döneminden beri benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, karşılaştığım her zorlukla manevi yardımları ile her zaman beni cesaretlendirip yanımda olan, bununla birlikte tez çalışmamın yabancı dillerdeki düzenlemelerine yapmış olduğu katkılardan dolayı kıymetli yol arkadaşım Sinem DEMİRKILIÇ'a

Hayatımın her anında yanımda olup, takıldığım her engelde arkamda duran, sabırla ve özveriyle beni destekleyip cesaretlendiren, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen en değerli varlıklarım babam Necat CANCA, annem Fatma CANCA ve ablam Çağrı CANCA'ya bütün kalbimle teşekkür ederim.

Emre CANCA

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Exiguobacterium acetylicum'un BİYOKİMYASAL VE BAZI ENZİMATİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Emre CANCA

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Amaç: Bu tez çalışmasında, atık sudan izole edilmiş *Exiguobacterium acetylicum*'un biyokimyasal karakterizasyonunun tespit edilmesi, kitinaz ve fitaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi, kitinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Prof. Dr. Neslihan Dikbaş Kültür Koleksiyonundan (ND 50) temin edilen *E. acetylicum* Nutrient Agar(NA) ve Nutrient Broth(NB) besiyerinde 37 °C'de 48 saat süre inkübe edilmiştir. *E. acetylicum*'un gelişme gösterdiği ekstrem koşullar belirlenmiştir. Bakterinin optimum süre ve sıcaklık değerleri belirlenmiş ve NB besiyerinde geliştirilmiştir. Bakterinin optimum düzeyde kitinaz enzimi ürettiği inkübasyon süresi ve besi ortamının belirlenmesi için NB'a sırasıyla %5, %10 ve %15 oranında kolloidal kitin varlığında her 6 saatte bir ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Bakterinin fitaz enzimi üretme kabiliyeti de incelenmiştir. Son aşamada kitinaz enziminin optimum sıcaklık ve pH değerleri tespit edilerek değerlendirilmiştir.

Bulgular: Biyokimyasal testler sonucu *E. acetylicum*, gram(+), katalaz (+), oksidaz (+), nişasta hidrolizasyon yeteneğine sahip olan, sütteki kazeini hidrolize edemeyen, indol(-), nitrat redüksiyon yeteneğine sahip olmayan ve yüksek şeker konsantrasyonlarına toleranslı bir bakteri olarak karakterize edilmiştir. Belirlenen optimum gelişim parametreleri ise 35°C, pH 7 ve % 2 tuzluluk olarak tespit edilmiştir. *E. acetylicum*'un kitinaz ve fitaz aktivitesi belirlenmiş ve optimum kitinaz aktivitesi 10g/L kolloidal kitinli NB besiyerinde 48. saatte belirlenmiştir. Kitinazın optimum sıcaklık ve pH değerleri ise 70°C ve 7.00 olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Tez çalışmasının sonucunda *E. acetylicum*'un kitinaz ve fitaz enzim aktivitesine sahip, ekstrem koşullarda gelişebilen dayanıklı bir bakteri türü olduğu belirlenmiştir. *E. acetylicum*'dan elde edilen kitinazın yüksek sıcaklık ve nötr pH değerinde optimum düzeyde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Endüstriyel uygulamalarda kullanım avantajı olabilecek, ekstrem özelliklere sahip bir bakteri karakterize edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Exiguobacterium acetylicum*, Kitinaz, Fitaz, Biyokimyasal Test, Enzim Aktivitesi

Ağustos 2020, 68 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

DETERMINATION OF BIOCHEMICAL AND SOME ENZYMATIC CHARACTERISTICS of *Exiguobacterium acetylicum*

Emre CANCA

Supervisor: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Purpose: In this thesis, it is aimed to determine the temperature and pH values of the chitinase enzyme, together with the determination of the chitinase and phytase enzyme activities after the biochemical characterization of *Exiguobacterium acetylicum* isolated from waste water..

Method: Prof. Dr. Neslihan Dikbaş Culture Collection (ND 50) obtained from *E. acetylicum* Nutrient Agar (NA) and Nutrient Broth (NB) were incubated in medium at 37 ° C for 48 hours. The extreme conditions in which E. acetylicum thrive has been determined. The optimum time and temperature values of the bacteria were determined and developed in NB medium. In order to determine the incubation time and the nutrient medium in which the bacterium produces chitinase enzyme at the optimum level, it was determined by measuring NB every 6 hours in the presence of 5%, 10% and 15% colloidal chitin, respectively. The ability of bacteria to produce phytase enzymes has also been studied. In the last step, optimum temperature and pH values of chitinase enzyme were determined and evaluated.

Results: Biochemical tests result in E. acetylicum, gram (+), catalase (+), oxidase (+), starch hydrolysis capable bacteria, unable to hydrolyze casein in milk, indole (-), not capable of nitrate reduction and tolerant to high sugar concentrations It has been characterized as. The determined optimum growth parameters were determined as 35 ° C, pH 7 and 2% salinity. Chitinase and phytase activity of E. acetylicum was determined and the optimum chitinase activity was determined at 48th hour in NB medium with 10g / L colloidal chitin. Chitinase optimum temperature and pH values were determined as 70 ° C and 7,00.

Conclusion: As a result of the thesis study, it was determined that E. acetylicum is a resistant bacterial species with chitinase and phytase enzyme activity that can grow under extreme conditions. It was determined that chitinase obtained from E. acetylicum showed optimum activity at high temperature and neutral pH. A bacterium with extreme properties has been characterized, which can be advantageous in industrial applications.

Keywords: *Exiguobacterium acetylicum*, Chitinase, Phytase, Biochemical Test, Enzyme Activity

August 2020, 68 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ x
GİRİŞ 1
Biyoteknoloji 2
Biyoteknolojinin Sınıflandırılması 3
Mavi biyoteknoloji 3
Beyaz biyoteknoloji 4
Kırmızı biyoteknoloji 4
Gri biyoteknoloji 4
Biyoteknolojinin Çalışma Alanları 4
Enzimler 5
Enzim aktivitesini etkileyen faktörler 6
Kitin ve Kitinaz (EC 3.2.1.14) 9
Kitinaz enziminin özellikleri ve kullanım alanları 10
Fitik Asit ve Fitat 12
Fitaz enzimi ve özellikleri (EC 3.1.3.8) 13
Çalışmanın Amacı 14
KURUMSAL TEMELLER 16
MATERYAL VE METOD 22
Materyal 22
Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar 22
Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler 23
Çalışmada kullanılan besiyerleri ve hazırlanışları 24
Çalışmada kullanılan çözeltilerin, tamponların ve substratların hazırlanması 25
Yöntem 26
Biyokimyasal Özelliklerin Tespit Edilmesi 27

*E. acetylicum'*un gelişme gösterdiği ekstrem koşulların belirlenmesi 28
E. acetylicum'dan kitinaz enziminin saflaştırılması, enzim aktivitesinin ölçülmesi 29
*Exiguobacterium acetylicum'*un fitaz enzim aktivitesinin belirlenmesi 32
ARAŞTIRMA BULGULARI 33
Biyokimyasal Testler Sonucunda Elde Edilen Bulgular 33
E. acetylicum'un Ekstrem Gelişim Gösterdiği Koşulların Tespit Edilmesi ve Bulguların Değerlendirilmesi 37
E. acetylicum'dan Kitinaz Enziminin Saflaştırılması ve Enzim Aktivitesinin Tespit Edilmesi 42
SONUÇLAR VE ÖNERİLER 48
KAYNAKÇA 50
ÖZGEÇMİŞ 55

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kitinaz enziminin kullanım alanları 11
Tablo 2. Bazı mikrobiyal fitaz kaynakları ve özellikleri 14
Tablo 3. Biyokimyasal testlerin sonuçları 36
Tablo 4. *E. acetylicum*'un farklı sıcaklıklarda (°C) sayım sonuçları 37
Tablo 5. *E. acetylicum*'un farklı sıcaklıklarda ölçülen OD (540 nm) değerleri 38
Tablo 6. *E. acetylicum*'unfarklı pH'larda sayım sonuçları 39
Tablo 7. *E. acetylicum*'un farklı pH'larda ölçülen OD (540 nm) değerleri 39
Tablo 8. *E. acetylicum*'un farklı tuz konsantrasyonlarında (%) sayım sonuçları 40
Tablo 9. *E. acetylicum*'un farklı tuz konsantrasyonlarında ölçülen OD (540 nm) değerleri ... 41
Tablo 10. Amonyum sülfat doygunluk aralıkları 43
Tablo 11. Kitinaz enzim aktivitesi ölçüm sonuçları 44
Tablo 12. Kitinazın optimum pH ölçüm sonuçları 45
Tablo 13. Kitinazın optimum sıcaklık ölçüm sonuçları 46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Biyoteknolojinin gelişimi....3
Şekil 2. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi....7
Şekil 3. pH konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi....7
Şekil 4. Sürenin enzim aktivitesi üzerine etkisi....8
Şekil 5. Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi....8
Şekil 6. Enzim konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi....9
Şekil 7. Kitinin kimyasal yapısı....9
Şekil 8. Kitosanın kimyasal yapısı....10
Şekil 9. Kitinin deasetilasyonu ile kitosanın oluşumu....10
Şekil 10. Fitik asidin biyokimyasal yapısı....13
Şekil 11. Fitatın fitaz enzimi ile hidrolizinin şematik gösterimi....13
Şekil 12. *E. acetylicum*'un katalaz testi sonucu....33
Şekil 13. *E. acetylicum*'un oksidaz testi sonucu....34
Şekil 14. *E. acetylicum*'un nişasta hidrolizasyon testi sonucu....34
Şekil 15. *E. acetylicum*'un kazein hidrolizasyon testi sonucu....35
Şekil 16. *E. acetylicum*'un indol testi sonucu....35
Şekil 17. *E. acetylicum*'un nitrat redüksiyon testi sonucu....36
Şekil 18. *E. acetylicum*'un şeker tolerans testi sonucu....36
Şekil 19. *E. acetylicum*'un farklı sıcaklıklarda (°C) sayım sonuçları....37
Şekil 20. *E. acetylicum*'un farklı sıcaklıklarda ölçülen OD (540 nm) değerleri....38
Şekil 21. *E. acetylicum*'un farklı pH'larda sayım sonuçları....39
Şekil 22. *E. acetylicum*'un farklı pH'larda ölçülen OD (540 nm) değerleri....40
Şekil 23. *E. acetylicum*'un farklı tuz konsantrasyonlarında (%) sayım sonuçları....41
Şekil 24. *E. acetylicum*'un farklı tuz konsantrasyonlarında ölçülen OD (540 nm) değerleri....41
Şekil 25. *E. acetylicum*'un kitinli besiyerinde 48 saatlik gelişme grafiği....43
Şekil 26. Amonyum sülfat doygunluk aralıkları....44
Şekil 27. Kitinaz enzim aktivitesi ölçüm sonuçları....45
Şekil 28. Kitinazın optimum pH ölçüm sonuçları....46
Şekil 29. Kitinazın optimum sıcaklık ölçüm sonuçları....47

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
+	Artı, pozitif
°C	Santigrat Derece
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
Å	Angström
ATP	Adenozin Trifosfat
C	Karbon
Ca	Kalsiyum
cfu	Colony Forming Unit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNSA	3,5- Dinitrosalisilik Asit
EC	Enzyme Commission
EU	Enzyme Unit
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
g	Gram
GTP	Guanozin Trifosfat
H_2O	Su
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
HCN	Hidrojen Siyanür
K	Potasyum
kDa	Kilo Dalton
Km	Substrat Afinitesi
KNO_3	Potasyum Nitrat
kob	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
M	Molarite
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar

mmol	Milimol
N	Azot
N_2	Azot
NA	Nutrient Agar
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NAD^+	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
$NADP^+$	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NB	Nutrient Broth
NH_4SO_4	Amonyum Sülfat
Nm	Nanometre
O	Oksijen
P	Fosfat
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Power of Hydrogen
PPYG	Proteaz Pepton- Maya Özütü-Glukoz Besiyeri
PYE	PDA(Potato Dextrose Agar)
RNA	Ribo Nükleik Asit
rpm	Devir/Dakika (Rounds Per Minute)
s	Saniye
spp	Alt Tür
subsps	Özel Tür
TCA	Trikloroasetik Asit
U	Unit
UV	Ultraviyole
V	Hacim
vb.	Ve benzeri
α	Alfa
β	Beta

GİRİŞ

Tabiat kendi bünyesinde çeşitli sayıda ve birbirinden tamamen farklı özelliklere sahip mikrocanlı türlerini barındırır. Mikroorganizmaların, hızlı bir şekilde, çok farklı ekolojik ortamlarda gelişim göstermeleri, ayrıca ekstrem şartlara adaptasyonları, bu organizmaların hem yapısal hem de hücresel düzeyde farklı özelliklerinin araştırılması gerektiğini göstermektedir. Çeşitli türlerde mikroorganizma türleri(bakteri, küf, maya, alg vb.) insanlığın hizmetine sunulmuş bulunmaktadır. Bakteriler bu mikroorganizma grupları arasında önemli bir yere sahiptir. İnsanlığa bahşedilen bu doğal hazine tarım, endüstri, sanayi, tıp, moleküler biyoloji ve bunun gibi birçok alanda kullanılmakta, gelişen teknoloji ile beraber bu organizmaların işlevselliği artmaktadır.

Mikroorganizmaların primer metabolitlerinden olan enzimler endüstriyel açıdan önemli bir kaynak olabilmektedirler ve kontrollü koşullar yaratıldığında üretimleri kolay ve hızlı olmaktadır. Son yıllarda oldukça büyük bir gelişim gösteren enzim sanayisi, desteğini büyük bir oranla enzim üretimi yeteneğine sahip mikroorganizmalardan almaktadır. Teknolojik öneme sahip mikroorganizmaların bazı özellikleri fermentörlerde kolayca üretilmelerine olanak sağlarken bazı karakteristik özellikleri üretimlerini sınırlandırmaktadır. Bu sınırlandırmaların önüne geçmek için ekstrem şartlarda üreyebilen mikroorganizmalara ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Ekstrem koşullarda gelişebilen *Exiguobacterium* cinsi; ekstrem koşullarda gelişebilen soğuk toleranslı, termostabiliteleri yüksek, pH aralıkları geniş ve yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilen bir bakteri grubu olmakla birlikte bu bakterilerden elde edilen biyomoleküller de yüksek derecelerdeki sıcaklıklara, değişken pH koşullarına, düşük sıcaklıklara ve yüksek tuz konsantrasyonlarına karşı dayanıklıdır.

Exiguobacterium acetylicum Bacillaceae ailesine mensup olan *Exiguobacterium* cinsi bakterilerin bir alt türüdür. *Exiguobacterium* yapısal özelliklerine bakıldığında hücreleri tek başına, çiftler veya zincirler halinde gelişen kısa çubuklara sahiptir. Genellikle fakültatif anaerobik, Spor oluşturmayan, katalaz ve gram (+) bir tür olarak bilinir (Collins *et at.* 2009).

Endüstriyel profilinin güçlü olduğu belirlenen bu bakteri enzim üretim kapasitesiyle de etkin bir rol oynayacağı kesindir. Bu nedenle izole edilen bu bakterinin biyokimyasal kimliği ve enzim üretme kapasitesi belirlenmelidir. *E. acetylicum* üzerine literatürde çok fazla çalışma yapılmadığından endüstriyel amaçla kullanımı yaygın değildir. Bu bakteri ekstrem koşullara

uygunluğu yönünden büyük avantaja sahiptir. Bakteri enzim üretimi dışında pek çok yönden de oldukça değerlidir.

Örneğin; Stanford News Service'teki bir makaleye göre *Exiguobacterium* cinsi bakterilerin plastiğin biyodegradasyonunda etkili rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Anonim 2020a).

Biyoteknoloji

Biyoteknoloji; moleküler biyoloji, hücre ve doku kültürü, fizyoloji, genetik, mikrobiyoloji ve biyokimya gibi doğa bilimlerinin yanı sıra elektrik-elektronik, makine ve bilgisayar mühendisliği gibi mühendislik dallarından yararlanarak, DNA teknolojisiyle hayvan, bitki ve mikroorganizmaları geliştirmek, doğal olarak var olmayan veya ihtiyacımız kadar üretilemeyen yeni ve az bulunan maddeleri elde etmek için kullanılan teknolojilerin tümüdür (Anonim 2020b).

Biyoteknoloji, temel bilim çalışmalarını kısa sürede yararlı ticari ürünlere dönüştürebilmesiyle bir anlamda kendi talebini de oluşturabilir. Bu yönüyle de diğer teknolojilerden ayrılmaktadır. Örneğin sıcak su kaynaklarında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen yüksek sıcaklığa dayanıklı Taq polimeraz enzimi uygulama ve temel bilim çalışmalarının ayrılmaz bir parçası olan PCR'nin önemli bir girdisidir.

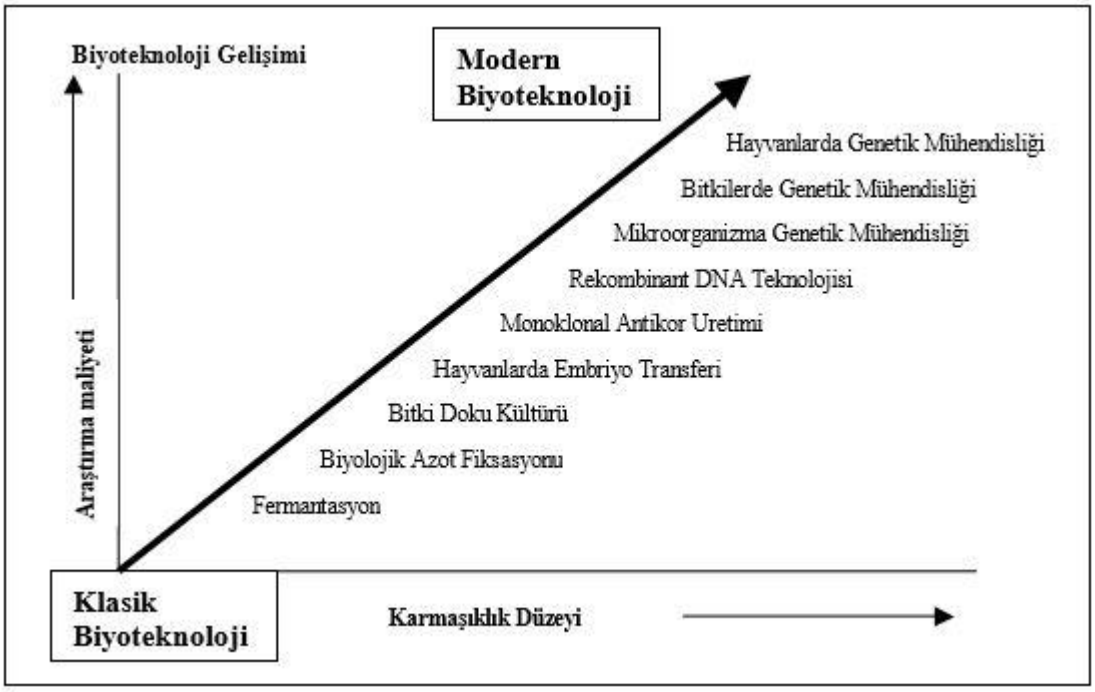
Biyoteknoloji uygulamaları; biyokimya, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, hücre biyolojisi, protein mühendisliği, immünoloji, biyoproses ve enzim teknolojileri gibi farklı disiplinleri bünyesinde bulundurmaktadır. Bu nedenle de biyoteknoloji birçok bilimsel alanla karşılıklı ilişki içinde gelişmektedir (Anonim 2020b).

Biyoteknolojik sistem ve süreçlerin kullanılmasının insan yaşamındaki yeri insanlık tarihi kadar eskidir. Örneğin bugün birer biyoteknoloji süreci oldukları bilinen bira yapımı, ekmek yapımı ve şarap yapımı gibi üretim süreçlerinin insanlık tarihinde çok eski bir geçmişi bulunmaktadır. Fermantasyonun mikroorganizmalarca gerçekleştirilen bir biyoteknoloji süreci olabileceği, ilk kez Louis Pasteur tarafından 19. yüzyılda gösterilmiştir. Aseton, bütanol ve penisilin gibi fermantasyon ürünlerinin endüstriyel ölçekte (ticari ölçekte) üretimleri 20. yüzyıllın ilk yarısında gerçekleştirilmiştir. Özellikle I. Dünya Savaşı sırasında gliserol, bütanol gibi patlayıcı yapımında ve penisilin gibi enfektif hastalıkların tedavisinde kullanılan fermantasyon ürünlerine duyulan büyük gereksinim endüstriyel ölçekteki fermantasyon biyoteknolojsi'nin kurulma ve gelişmesinde önemli bir rol oynamıştır. Fermantasyon Biyoteknolojisi'nin gelişimi sırasında elde edilen teknolojik bilgi birikimi ve kazanımlar klasik biyoteknoloji olarak tanımlanan biyoteknoloji süreçlerinn ilerlemesine büyük katkıda

bulunmuştur. Klasik Biyoteknoloji süreçlerinin kullanıldığı fermantasyon teknolojileri günümüzde de çeşitli bitkisel ve hayvansal endüstriyel ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Ünal 2020).

Biyoteknolojinin Sınıflandırılması

Biyoteknoloji kavramı oldukça geniş bir araştırma ve çalışma sahasına sahiptir. Özellikle klasik biyoteknolojinin talepleri tam anlamıyla karşılayamaması sorunuyla büyük bir ivme kazanan modern biyoteknoloji bu çalışma alanlarının daha fazla genişlemesini sağlamıştır. İnsan nüfusunun büyük bir hızla artışı gıda biyoteknolojisinin de hızla gelişmesine olanak sağlamıştır. Bununla beraber tarım ve hayvancılık faaliyetlerinin kazandığı ivme tarımsal biyoteknolojinin önünü açmıştır. Moleküler biyoloji kavramının gelişmesiyle ile beraber yeni biyoteknolojik kavramlar ve yaklaşımlar da hızla gelişmiş ve bilim dünyasında yerini almıştır.



Şekil 1. Biyoteknolojinin gelişimi

Biyoteknoloji kavramını temelde 4 ana başlık altında incelemek mümkündür. Bunlar:

Mavi biyoteknoloji

Mavi biyoteknoloji, özellikle gıda, teknik, tıbbi ve biyolojik olarak aktif maddelerin oluşturulmasında deniz ürünlerinin kullanılmasına odaklanmaktadır (Matyushenko et al 2016). Bununla birlikte çeşitli deniz canlılarının soylarını koruma altına almak gibi çalışmalar da örnek verilebilir (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2012).

Beyaz biyoteknoloji

Diğer adı endüstriyel biyoteknoloji olan beyaz biyoteknoloji; mikroorganizmalardan farklı özelliklerdeki yarayışlı kimyasal maddelerin elde edilmesi veya farklı enzimlerin kirletici kimyasalları ortadan kaldıracak şekilde üretilmesi ve bu amaçla kullanılmasıdır (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2012). Buna ek olarak, daha önce kimya endüstrisi tarafından üretilmiş alkol, vitaminler ve amino asitler gibi ürünlerin üretimine odaklanan biyoteknolojik yöntemleri de içermektedir (Matyushenko et al 2016).

Kırmızı biyoteknoloji

Biyoteknoloji kavramının en önemli çalışma alanlarından biri de kırmızı biyoteknolojidir. Bu sınıfta gerçekleştirilen biyoteknolojik işlemler; oluşabilecek hastalıklara karşı yeni ilaçların modifiye edilmesinde etkin bir role sahiptir. DNA çipleri, biyolojik sensörler vb. biyoteknolojik uygulamalarda büyük önem üstlenmektedir (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2012).

Gri biyoteknoloji

Gri biyoteknoloji çevreyi koruyan teknolojiler ve ilaçlarla ilgili konuları incelemektedir. Toprak ıslahı, deşarj arıtımı, kirlilik seviyesinin azaltılması, endüstriyel atıkların geri dönüşümü ve kullanımı, biyoprosesler ve biyolojik olarak aktif ajanlar yardımıyla toksik maddelerin bozulması gibi kavramlar temel araştırma konusunu oluşturmaktadır (Matyushenko *et al* 2016).

Biyoteknolojinin Çalışma Alanları

Dünya nüfusu artışına günden güne artışına devam etmekte ve artan nüfusla beraber temel besin kaynaklarına olan ihtiyaçta hızla artmaktadır. Bu durum yalnızca temel besin kaynağına olan ihtiyacı arttırmıyor bunun yanı sıra barınmaya ve sağlığa olan ihtiyaçlarında artmasına sebep olmaktadır. Oluşan bu ihtiyaçların varlığı teknolojinin gelişimini desteklemektedir.

Teknolojinin gelişmesi yeni çalışma ve araştırma kollarının var olmasına olanak sağlamaktadır. Biyoteknolojik çalışmalar insanların ihtiyacını karşılayabilmek adına her geçen gün artış göstermektedir. Biyoteknoloji insanlığın hayatını kolaylaştırabilecek tüm çalışma alanları üzerinde faaliyet göstermektedir.

Biyoteknoloji tıp dünyasında farklı hastalıklara çözüm olmak amacıyla hazır kitlerin ve yeni çeşit ilaçların üretilmesiyle etkinliğini göstermektedir. Biyoteknolojinin yardımına özellikle genetik hastalıklar, kanser hastalığının kaynağının tespiti ve tedavisi gibi uygulamalarda ihtiyaç duyulur. Tıp alanında en çok yardımına ihtiyaç duyulan alan ise aşı üretimi ve geliştirilmesidir (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2012).

Çevre biyoteknolojisinin önemli işlemlerinden birisi doğal mikroorganizmalarla pis atıkların temizliğinin yapılmasıdır. Ayrıştırılmassında güçlükler yaşanan atık ürünleri arıtabilmek için genetiğinde modifikasyonlar yapılmış mikroorganizmaların yardımı söz konusudur.

Çevre biyoteknolojisinde yapılan önemli uygulamalardan biri de kirli suların tekrardan kullanışlı hale getirilmesidir (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2012).

Tarımsal biyoteknolojide ise bu uygulamalar; istenilen genlerin bulunması, karakterize edilmesi, izole edilmesi ve hedeflenen hücreye aktarılması aşamalarından meydana gelmektedir Hedeflenen genlerin tespiti ile başlayan biyoteknolojik süreç özellikle bitkiler üzerinde yapılan gen aktarımı, gen susturulması gibi uygulamalarla devam etmektedir.

Tarımsal biyoteknolojide genetik metotların yanı sıra diğer bir önemli disiplin ise enzim ve mikrobiyal biyoteknolojidir. Mikroorganizmalar ve enzimler biyoteknolojinin vazgeçilmez bir bütünüdür ve tarımsal biyoteknoloji alanında yapılan çalışmalarda mikrobiyal ve enzim kaynaklı üretimler bu disiplinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Enzim üretme yeteneğine sahip mikroorganizmalar belirtilen şartlarda geliştirildikten sonra elde edilmek istenilen enzime göre hazırlanan substratlarla üretim desteklenir ve böylece tıptan tekstile kadar günümüz teknolojisinde çok önemli yeri olan enzimlerin üretimi biyoteknolojik yöntemlerle gerçekleştirilir.

Biyoteknoloji temel bilimler başta olmak üzere insanlığın ihtiyacı olan birçok alanda hizmet vermeye devam etmektedir.

Enzimler

Enzim kelimesi tarihte ilk olarak Kühne isimli bir araştırmacı tarafından 1878 senesinde kullanılmış, sadece canlılık özelliğine sahip hücrelerce sentezlendiği belirtilmiştir (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2012).

Enzimler kimyasal reaksiyonları katalize eden biyolojik yapılardır. Bu reaksiyonlar tüm canlı organizmaların metabolizmasının temelini oluşturur ve endüstrinin verimli ve ekonomik biyokatalitik dönüşümleri destekler (Beilen and Li 2002).

Diğer bir tanımı biyolojik katalizör olan enzimler, besleyici özelliği olan moleküllerin yıkımının yapıldığı, kimyasal enerjinin depo edildiği ve şeklinin değişime uğratıldığı, temel öncüllerden biyo-makromoleküllerin oluşturulduğu metabolik yolaklarda binlerce reaksiyon basamağını katalizleme becerisine sahiptirler (Anonim 2020c).

Enzimler sadece kendi aktif bölgesinin biçimsel yapısına uygunluk gösteren substrat ile tepkimeye girebilirler. Bu sebepten ötürü her enzim sadece kendisiyle uygun yapıdaki substrata etki etmektedir. Bu duruma enzim spesifikliği denilmektedir (Akkaya ve Pazarlıoğlu 2012).

Enzimlerin kimyasal yapıları, protein ve protein olmayan mineral maddeler ya da vitamin bölümünden oluşmaktadır. Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için ihtiyaç olunan, ve protein yapıda olmayıp çoğunlukla metal iyonlarını içeren küçük gruplarına kofaktör, kompleks organik bileşik içeren yan gruplarına ise koenzim denilmektedir. Koenzimlerin enzim proteini adı verilen yapılarla sıkı kovalent bağlarla bağlanan ve bu yapıdan kopmayan yapılarına prostetik grup adı verilir (Şenol 2014).

Enzimler temel biyoteknolojik uygulamalar olarak kabul edilen; ekmek, yoğurt, vs. gibi ürünlerin elde edilmesinde fark edilmeden kullanılarak tarihte yerlerini almışlardır. Geçtiğimiz yüzyıllardan itibaren enzim alanında yapılan çalışmalar zamanla arttırılmıştır.

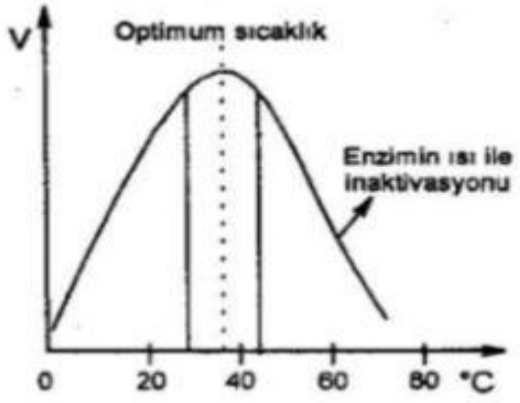
Yapılan ilk enzimatik çalışmalar, sindirim enzimlerin araştırılmasının başladığı 1760-1825 seneleri arasında gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 1825 yılında Berzelius isimli araştırmacı, nişasta molekülünün sindiriminde etki gösteren bitkisel kaynaklı enzimler üzerinde çalışmalar yapmış olup sonrasında, 1860 yıllarında Pasteur fermantasyon yeteneğine sahip enzimlerin üzerinde yoğunlaşıp bu yönde çalışmalar yapmıştır. Fermantasyon ile ilişkisi olmasından ötürü ilk olarak ferment adı verilmiş fakat 1878 yılında Kühne tarafından Yunanca'da "mayanın içinde" anlamında olan enzim kelimesi ile güncellenmiştir. İlk enzim molekülü olan üreaz, biyolog J.B. Sumner tarafından 1926 senesinde soya fasulyesini özünden saf, kristal yapıda olarak izole edilmiştir. Sonrasında, 1930 ve 1936 yılları arasında pepsin, kimotripsin ve tripsin enzimleri başarılı bir şekilde saflaştırılmış ve kristallerin protein yapısında oldukları doğrulanmıştır. Bu çalışmalar sonucu enzimlerin protein yapısında olduğu ispatlanmıştır (Dinç 2009).

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler

Enzim aktivitesini etkileyen çok sayıda faktör mevcuttur. Bu faktörler; pH, sıcaklık, reaksiyon süresi, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, su aktivitesi, enzim inhibitörleri, enzim aktivatörleri, reaksiyon ürünleri, basınç, gibi çeşitli fiziksel faktörlerin yanında, hormonların etkisi gibi kimyasal faktörlerde bulunmaktadır. Sıcaklık, süre, pH, enzim konsantrasyonu ve substrat konsantrasyonu bu faktörlerden başlıcaları olmakla beraber, sonraki kısımda ele alınmıştır (Şenol 2014).

Sıcaklık

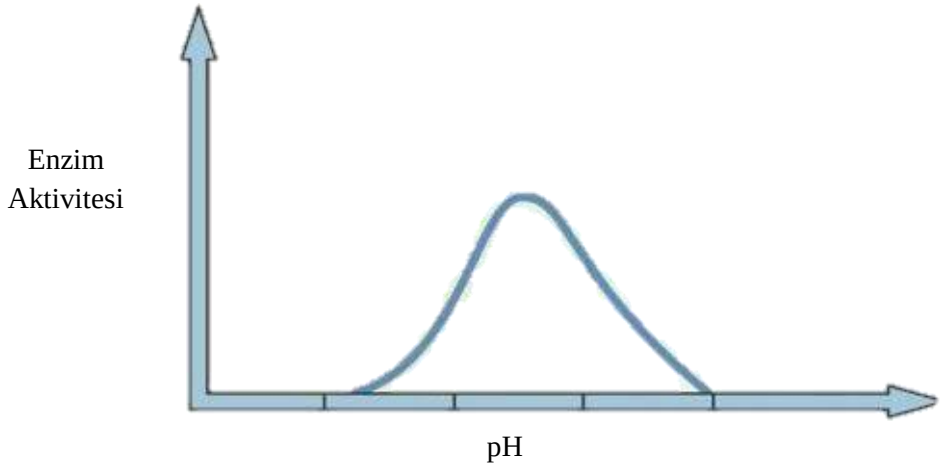
Enzimatik tepkimelerde sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışmanın artışına bağlı olarak genellikle reaksiyonun hızı artmaktadır. Reaksiyon hızının en yüksek düzeye ulaştığı sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Enzimler protein yapısı ihtiva ettikleri için optimum sıcaklık üzerinde enzimin yapısı denatüre olmakta ve tepkime hızı azalarak sıfıra inmektedir (Batur 2012).



Şekil 2. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi

pH konsantrasyonu

Enzimin reaksiyon hızı, ortamın pH' ına da bağlıdır. Bir enzimin reaksiyonun en yüksek hızda gerçekleştiği pH'ya enzimin optimum pH'sı denir. Optimum pH'nın altında ve üstünde reaksiyon hızı azdır (Fidancı 2010).

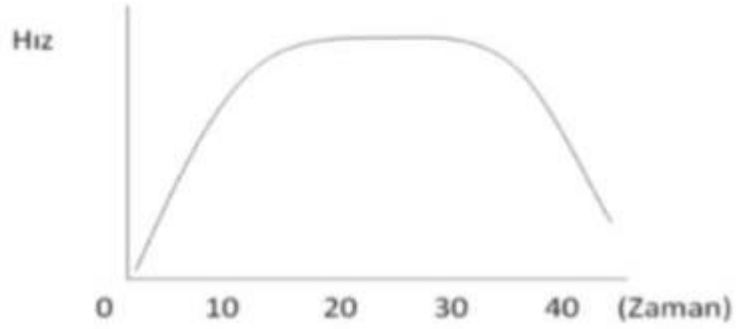


Şekil 3. pH konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi

Süre

Şekil 7'de de görüldüğü gibi enzim reaksiyonlarında hız süre ilerledikçe azalmaktadır. Bunun sebebi ortamda bulunan substrat azalması yada tükenmesiyle ortamda bulunan

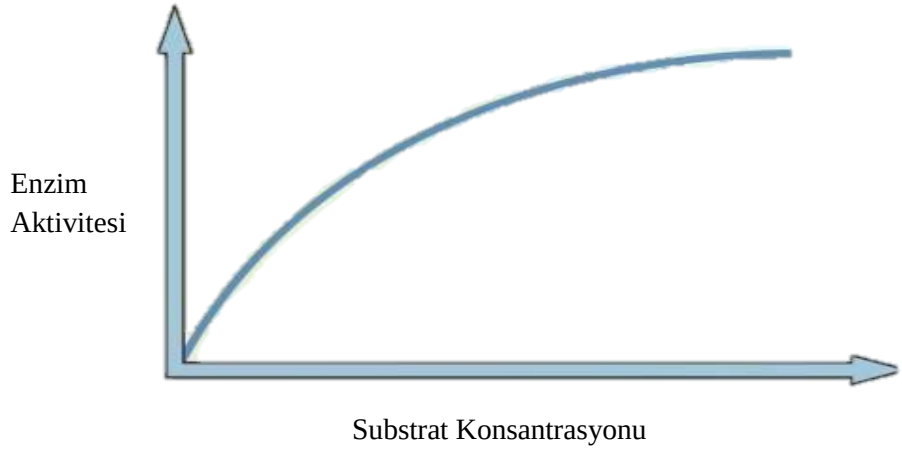
substratın yapısının bozuluyor olabilmesidir. Bu yüzden genellikle enzim ölçümleri başlangıç süresi dolaylarında yapılmaktadır (Şenol 2014).



Şekil 4. Sürenin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Substrat konsantrasyonu

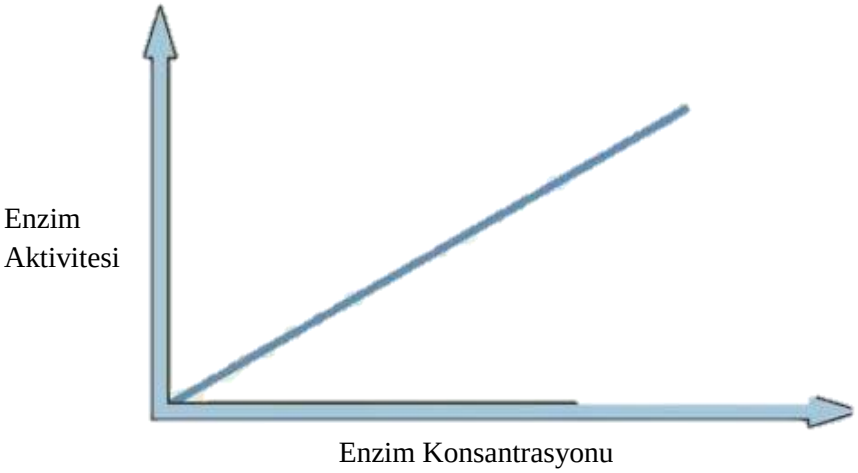
Substrat konsantrasyonunun arttırılması, reaksiyonu ilk başlarda doğrusal olarak arttırır. Sonrasında substrat ilave edildikçe hız gittikçe daha az artar. Maksimum doygunluğa ulaşıldığında enzimde substrat bağlayacak tüm boşluklar dolu olduğundan, eklenen substrat artık enzime bağlanamaz ve enzimatik tepkimenin hızı sabit kalır (Şenol 2014).



Şekil 5. Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim konsantrasyonu

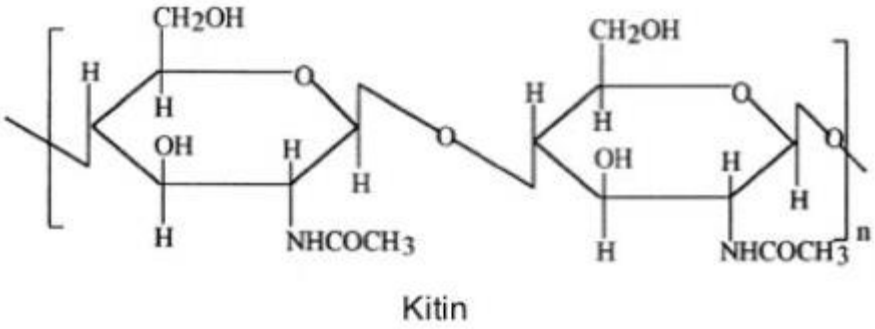
Ortamda mevcut olan enzim konsantrasyonunun da enzimatik reaksiyonların hızına etkisi vardır. Bahsedilen bu etki doğrusal bir şekilde meydana gelmektedir. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamda ne kadar fazla miktarda enzim aktif olarak çalışıyorsa, substratın bulunduğu süre boyunca reaksiyon hızını arttırarak devam etmektedir (Şenol 2014).



Şekil 6. Enzim konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

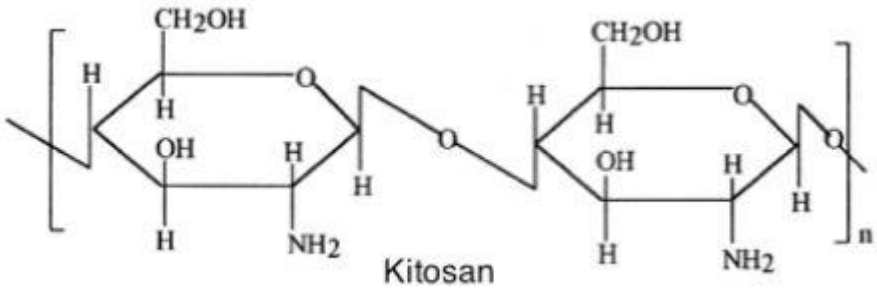
Kitin ve Kitinaz (EC 3.2.1.14)

Kitin kimyasalı, N-asetil-D-glukozaminin polimeri olan biyokimyasal bir maddedir. Kitin ilk olarak 1811 yılında, Fransız kimyacı H. Broconnot tarafınca tepit edilip tanımlanmıştır. Kitin sözcüğü anlamını, Yunanca "zırh" sözcüğünden almaktadır ve dünyada en çok bulunan ikinci biyolojik polimerdir. Kitin, böcek, mantar, maya, yosun, yengeç ve karideslerin dış iskeletinde ve diğer omurgasızların iç kısmında mevcut olarak bulunmaktadır. Kitin biyopolimeri beyaz, sert, elastik yapıda olmayan bir polisakkarittir. Karasal ekosistemlerde bulunan kitinin büyük kısmını mantarlar meydana getirir. *Streptomyces* ve *Actinobacteria* gibi bazı bakterilerin de dış kılıfında kitin olabileceği tahmin edilmektedir. (Yılmaz 2019).



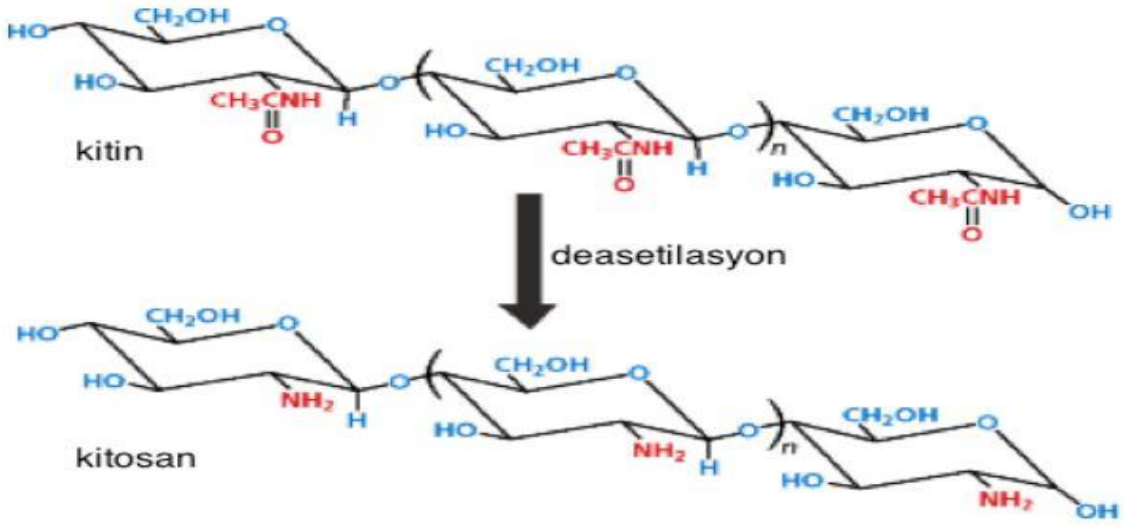
Şekil 7. Kitinin kimyasal yapısı

Kitinin birçok türevi bulunmaktadır ve bunlar arasında en önemlisi kitosandır. Kitosan kitinden deasetile edilir (Üçgül vd. 2016).



Şekil 8. Kitosanın kimyasal yapısı

Kitosan, yengeç ve karides gibi kabuk ihtiva eden deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanat kısımlarında, mantarların hücre duvarları gibi kısımlarda bulunan doğal bir polisakkarit olan kitinden kısmi deasetilasyon yoluyla üretilen, reaktif fonksiyonel amino grupları içeren; kimyasal yapı olarak selüloza benzerlik gösteren ve doğada selülozdan sonra en çok rastlanan biyopolimerlerdendir (Şenol 2014).



Şekil 9. Kitinin deasetilasyonu ile kitosanın oluşumu

Kitosan başta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, kâğıt ve tekstil olmak üzere birçok farklı dalda kullanım alanı bulmuştur (Üçgül vd 2016).

Kitosanın tekstil sanayinde birçok amaç için kullanımı mevcuttur. Bu amaçlar, antimikrobiyel özellik sağlaması, yünlü kumaşlarda stabilite sağlaması, reaktif boyamada tuz oranını azaltması, pamuğun asit boyarmaddelerle boyanma özelliğini kazanması, antistatik özellik kazandırması, deodorant temel maddesi olarak kullanılması şeklinde sıralanabilir (Olcay 2015).

Kitinaz enziminin özellikleri ve kullanım alanları

Kitinin hidrolizlenmesinde görev alan iki tip enzimden en önemli rolü kitinazlar [poli-β-1,4(2-asetamid-2-deoksi)-D-glukozit glikanohidrolaz, EC 3.2.1.14] üstlenmektedir.

Kitinazlar endokitinazlar ve ekzokitinazlar olarak iki alt gruba ayrılmaktadırlar. Endokitinazlar N-asetilglukozaminin multimerlerini oluştururken, ekzokitinazlar ise polimerin indirgenmemiş uç tarafından başlayan, düşük molekül ağırlığına sahip, çözünebilen dimerlerin sürekli serbest bırakılmasını kataliz ederler. İkinci tip enzim olan kitobiazlar ise kitobiozu, N-asetilglukozamine hidrolize ederek yapısal özelliğini göstermektedir (Suginta *et al.* 2005).

Farklı organizmalar farklı çeşitlilikte hidrolitik enzimleri üretmektedirler. Bu enzimler farklı substrat özgüllükleri gösterir ve çeşitli görevler üstlenmektedirler. Bakterilerde kitinazların görevi; beslenme ve mantar, protozoa ve omurgasızlara karşı parazitlik özelliği göstermektir. Buna ek olarak morfogenezin de kapsamındadırlar. Kitinazlar, bitki ve omurgalıların savunma mekanizmalarında da aktif rol oynamaktadırlar. Böcek zararlılarının biyolojik kontrolünde kullanılan baculoviruslar bir çeşit patojenik etki olarak kitinaz üretirler. İnsan serumunda da kitinaz enzim aktivitesi tanılanmıştır (Hacıabdullahoğlu 2018).

Kitinazlar özellikle bitkilerdeki patojenik mantarlara karşı biyokontrolde, kitin oligosakkaritlerinin ve tek hücre proteini üretimi gibi birçok endüstri ve tarım alanındaki uygulamalarda kullanılırlar (Şenol 2014).

Kitinaz enzimi her sene pek çok deniz canlısının sığınağı olan kabukların içindeki canlıların yaşamını yitirmesi sonucu, okyanus ve denizin derinlerinde kirliliği önlemektedir. Özellikle *Vibrio furnisii* olarak adlandırılan bakteriler deniz ve okyanuslarda en önemli kitin parçalayan bakteriler olarak görev almakta ve bu bakterilerin meydana getirdiği kitinaz bir dizi kimyasal işlemden sonra kitini glikoz ve amonyağa çevirmektedir (Kuzu 2008).

Tablo 1. Kitinaz enziminin kullanım alanları (Hamid *et al.* 2013)

KULLANIM ALANI	UYGULAMA
BİYOLOJİK ARAŞTIRMALAR	• Mantar protoplastlarının izole edilmesi • Morfogenez kaynaklı çalışmalar • Hücre duvarı oluşturulması • Enzim sentezinin sağlanması
BİYOKONTROL AJANI OLARAK KULLANIMI	• Bitkilerde mantar kaynaklı patojenlerin büyümesinin durdurulması • Sivrisinek gelişiminin engellenmesi kontrolünün sağlanması • Tarım zararlılarına karşı biyopestisit
BALIK ATIKLARININ DEGRADASYONU	• Atıkların faydalı ürünlere dönüşümü • Kitooligosakkaridler insanlar üzerinde etki gösteren ilaçlarda kullanılışlığının tespiti • THP • Kimyasal ve farmasötik ara ürünler için glukozamin • Tatlandırıcılar, gıda destekleri

Denizler yüksek miktarda kitin atığı ihtiva ettiğinden dolayı, denizler içerisinde yüksek verime sahip kitinaz üretici organizmaların görülmesi muhtemeldir. Bu organizmalar ilaveten kıyı kesimlerde de görülmektedir. Kitin, mantar hücresinin hücre duvarı için kıymetli bir yapısal bileşen olduğundan, kitinaz enzimi sentezleyen mikroorganizmaların ve bitkilerin değişik mantar hastalıkları için biyokontrol ajanı tespit edilmiştir. Biyokontrol için kitin aktivitesine sahip mikroorganizmaları kullanmak tarımsal fitopatojenleri kontrol altında tutmak için alternatif bir yöntem sunmaktadır (Brzezinska *et al.* 2013).

Fitik Asit ve Fitat

Fitik asit, diğer ismiyle myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate fosforillenmiş şeker alkolü sınıfına giren bir yapıdır. Başka bir deyişle fitik asit, 6 değerli ve halka formuna sahip olan inositolün fosforik asitlerle oluşturmuş olduğu ester yapılarıdır. Fitik asitin tuz formu ise fitat olarak isimlendirilmektedir (Tran 2010).

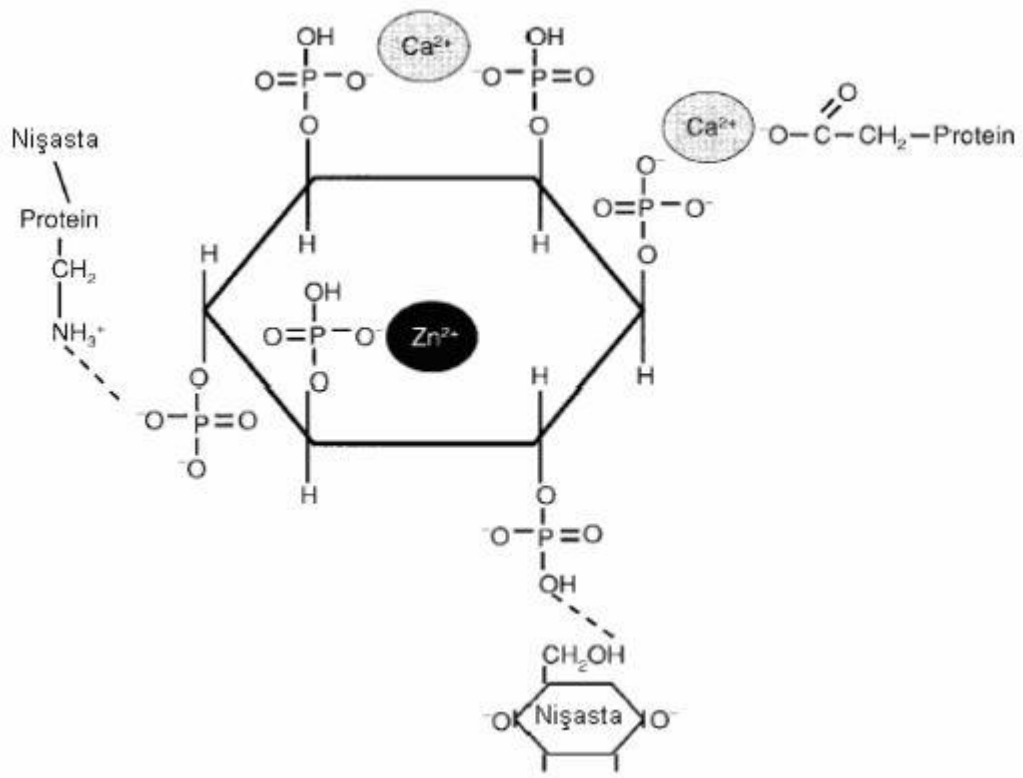
Fitik asit genel olarak bitki tohumlarında izole edilmektedir. Tohumların yanı sıra fitik asit meyve ve sebze köklerinde de görülmektedir. Ayrıca fitik asit, baklagil tohumlarında Mg-K-Ca-Na tuzları şeklinde bulunur (Asan 2007).

Fitik asit ile divalent katyonların meydana getirdiği kompleks, pH 4.0-8.0 arasında çözünürlük oranı çok azdır. Bu olay, minerallerin absorbsiyonu ve sindirilmesini olumsuz yönde etkiler. Bu bilgi fitik asitin gıdalarda besin değerini düşürdüğü fikrini vermektedir. Bu sebeplerden dolayı fitik asit, insanlar ve hayvanlar için besin karşıtı bir etken olarak kabullenilmiştir (Çalışkan Özdemir 2018).

Fitat ilk kez Hartig tarafından 1855 ve 1856'da çeşitli bitkilerin tohumlarından küçük, nişastasız parçacıklar olarak elde edilmiş ve yıllar içerisinde diğer araştırıcılar tarafından birçok kez izolasyonu tekrar edilerek; temel kimyasal yapısında C, P ve metal iyonları içerdiği doğrulanmıştır (Çalışkan Özdemir 2018).

Mikrobiyal fitat kaynakları sınıfına birçok fungus, bakteri ve maya türü girmektedir. Bakteriyel kaynaklı fitatlar *Serratia marcescens, Escherichia coli, Shigella sp., Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis* gibi birçok mikroorganizma türünden elde edilmiştir (Kumar 2011).

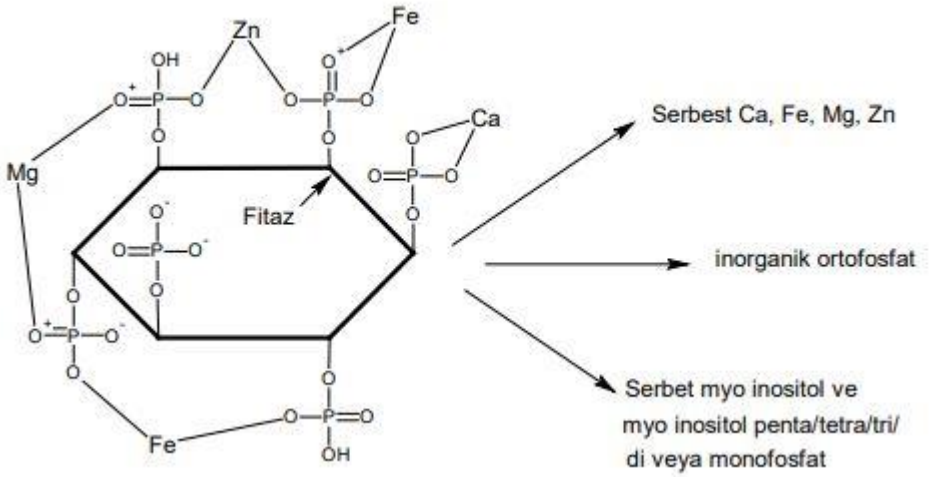
Fitat ve inorganik fosfat içeriği yüksek dışkılama sebebiyle alg patlaması tetiklenebilmekte ve yüzey sularında ötrifikasyon olayı meydana gelebilmektedir. Ekonomik açıdan ise yemlere ilave edilen inorganik fosfor kaynakları da üretimin maliyetini arttırmaktadır (Oh *et al.* 2004)



Şekil 10. Fitik asidin biyokimyasal yapısı

Fitaz enzimi ve özellikleri (EC 3.1.3.8)

Fitaz enzimi, kimyasal olarak myo-inositol-hexakisfosfat-3-fosfohidrolaz olarak tanımlanmaktadır. Uluslararası biyokimya birliği, 3-fitaz ve 6-fitaz olmak üzere birbirinden ayırmaktadır. Burada 3-fitazlar mikroorganizmalar için genel olurken, 6- fitazlar ise bitkiler için genel olmaktadır (Erkek ve Ünlü 2003).



Şekil 11. Fitatın fitaz enzimi ile hidrolizinin şematik gösterimi

Fitazlar, genel olarak 40-100 kDa moleküler ağırlığa sahip monomerik protein olarak değerlendirilirler. Geniş substrat özgüllüğü göstermektedir. Fitazın kristal yapısı, 2.5 A° çözünürlükte tanımlanmıştır (Baygın 2015).

Fitazlar, fitatın miyo-inositol halkasından fosfat gruplarının kademeli bir şekilde uzaklaştırılması reaksiyonunu katalizeleyen enzimlerdir. Fitazlar tabiatta birçok yerde bulunur ve 2000'den fazla mikrobik toprak izolatı olduğu belirlenmiştir. Katalitik mekanizmaya göre fitazlara; histidin asit fitazlar, sistein fitazlar veya mor asit fitazlar denilebilir (Wulandari 2015).

Fitazı parçalayan enzimler ile yapılan çalışmalarda yem hammaddelerinin gıdalardaki fitat oranını düşürmek için özellikle günümüzde çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Fitatı hidrolize eden enzimler bitkisel materyalin besleyici değerini arttırmak için yapılması gerekmektedir. Son zamanlardaki çalışmalarda fitaz enzimlerinin hayvan yetiştiriciliği yapılan yerlerde hayvan gübresiyle oluşan fosfor kirliliğini azaltmak amacıyla kullanımı söz konusu olmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğunda fitatı hidrolize eden enzimlerin fitatdan fosfor kullanışlılığını arttırmış olup, çevrede ortofosfat birikimini büyük miktarda azalttığı saptanmıştır (Kılıç 2017).

Tablo 2. Bazı mikrobiyal fitaz kaynakları ve özellikleri (Greiner and Konietzny 2006).

Fitaz Kaynağı	Optimum pH	Optimum Sıcaklık
Aspergillus niger	2.2 – 5.5	55-58
Aspergillus terreus	5.0-5.5	70
Myceliophthora thermophila	5.5	-
Penicillium simplicissimum	4.0	55
Penicillium lycii	5.5	58
Saccharomyces castelii	4.4	77
Cladosporium	3.5	40
Escherichia coli	4.5	55-60
Klebsiella pneumoniae	5.0-5.5	50-60
Klebsiella aerogenes	4.5-5.2	68
Bacilus subtilis	6.5-7.5	55-60
Bacillus amyloliquefaciens	7.0-8.0	70

Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışması, atık sudan izole edilmiş ekstrem koşullarda gelişebilen bir bakteri grubuna dahil olan *E. acetylicum'*un biyokimyasal özelliklerini, gelişim gösterebildiği ekstrem koşulları, fitaz ve kitinaz üretme kabiliyetini ve *E. acetylicum*'dan kısmi olarak saflaştırılan kitinaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerlerini belirlemeyi amaçlamıştır. İlk olarak

biyokimyasal tesler yapılmış ve bakterinin karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Daha sonra gelişim gösterebildiği ekstrem koşullar belirlenmiş ve gelişme eğirisi oluşturulmuştur. Son aşamada ise fitaz ve kitinaz enzimlerini üretebilme kabiliyeti, kitinaz enzimi üretimi için optimum koşullar ve kitinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerleri belirlenmiştir.

KURUMSAL TEMELLER

Collins *et al.* (1983), yapmış oldukları çalışmada; *Exiguobacterium* cinsinin hücrelerinin, genç kültürlerde küçük çubuklardan kokoidlere kadar değiştiğini belirtmişlerdir. *Exiguobacterium*'un ayırt edici özelliklerini şöyle sıralamışlardır: Gram (+), hareketli, fakültatif anaerobik, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve spor olmayan yapıdalardır.

Meng *et al.* (2020), e göre *Exiguobacterium* cinsi ile ilgili bir gölden izole ettikleri ve ekstrem koşullara dayanıklı bakteri olarak tespit ettikleri *E.flavidum* türü bakteri ile *E.acetylicum'un* akraba olduklarını filogenetik ağaçla tespit etmişlerdir. Bakterinin esteraz, lipaz ve β-galaktosidaz enzim aktiviteleri gösterdiği belirtilmiştir. Yakın akraba olan *E.acetylicum'*un fitaz ve kitinaz aktiviteleri bu tezde incelenmiştir.

Selvakumar *vd.* (2009), yaptıkları bir çalışmada; *E. acetylicum'*un Gram (+), çubuk şekilli, sarı pigmentli, Hidrojen Siyanür (HCN) üreten bir bakteri olduğunu belirtmiş ve *Rhizoctonia solan*i, *Sclerotium rolfsii, Pythium* ve *Fusarium oxysporum*'un büyümesini ve gelişimini inhibe ettiğini belirlemişlerdir.

Vishnivetskaya *et al.* (2009), yaptıkları çalışmada; *Exiguobacterium spp.* tip suşlarının geniş bir moleküldan izole edildiğini belirtmişlerdir. Buna ilaveten -12 ile 55 ° C sıcaklık aralığında soğuk ve sıcak ortamlar dahil olmak üzere geniş bir habitatta gelişebildiği bildirilmiştir.

Kasana and Pandey (2018), *Exiguobacterium* cinsinin geniş bir sıcaklık aralığında büyüyebilme yeteneğinin bu cinsi tarımsal, endüstriyel ve çevresel faaliyetlerde ilgili ürünler geliştirmek adına uygun bir aday yapabiliceğini belirtmişlerdir.

Yarza *et al.* (2008), *Exiguobacterium* suşlarının izolasyonu hakkında yeni raporların ortaya çıkmaya devam ettiğini bildirmişlerdir. Farklı habitatlardan izole edilmiş suşların genomik çeşitliliği hakkında bilgi oldukça sınırlı kalmaktadır. Küçük alt birim ribozomal RNA'nın dizilerine dayanarak, *Exiguobacterium* cinsinin türleri *Bacillus* cinsinin yakınında kümelendiği belirtilmiştir.

Gee *et al.* (1980), yapmış oldukları çalışmada; *Exiguobacteria* familyasının, flagella aracılığıyla hareketli olduklarını saptamışlardır. PPYG agarında 25 ° C'de 3 günlük inkübasyon sonucunda *Exiguobacterium aurantiacum* kolonilerinin 2-3 mm çapında ve düşük dışbükey, turuncu, opak, bütir ve kolaylıkla emülsifiye olabilen bir yapıda oldukları gözlemlenmiştir.

Gee *et al.* (1980), yaptıkları bir çalışmada; PYE agarında *Exiguobacterium acetylicum* kolonilerinin düzensiz kenarlara sahip olduklarını bununla beraber sarı-turuncu renkte olup ortamda pigment yaymadıklarını saptamışlardır.

Kumar *et al.* (2006), yaptıkları çalışmada; bazı *Exiguobacterium* suşlarının biyoteknoloji, biyolojik iyileştirme, endüstri ve tarım gibi birçok önemli işleme alanına sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Anuradha and Revathi (2013), yapmış oldukları çalışmada; kabuklu hayvanların kabuk kısımlarından izole ettikleri *Exiguobacterium, Vibrio aestuarianus, Flavobacterium* ve *Shewenella* suşlarının kitinaz enzimini üretme yeteneğine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Aliabadi *et al.* (2014), gerçekleştirdikleri çalışmalarında; *E. acetylicum* suşunun *Escherichia coli, Shigella flexneri, Staphylococcus aureus, Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal bir aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Huang *et al.* (1996), kolloidal yapıdaki yengeç kabuğu kitinini temel karbon kaynağı olacak şekilde kullanan *Aeromonas sp.* No. 16 suşunun izolasyonunu sağlamışlardır. Bakterinin kitinaz enzimi üretme yeteneğine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Enzimin 500 ml hacme sahip erlende 1.4 U/ml^{-1} aktivite gösterirken, 5:l hacme sahip fermentörde 1.5 U/ml^{-1} aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Wiwat *et al.* (1999), yapmış oldukları çalışmalarında *Bacillus circulans* No.4.1 suşunun kitinaz enzimini ürettiğini ve bu kitinazın geniş bir pH aralığında (6,0- 12,0) kitini hidroliz ettiğini, kitinazı kodlayan gen *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*'ye aktarılırsa böceklerle biyolojik savaşta kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Radjacommare *et al.* (2004), yaptıkları çalışmada bitki gelişimine yardımcı kitinaz üreten bakteri suşları bitkiler üzerinde uygulanmış ve bitkilerin zararlı bir mantar olan *R. solani'*ye karşı kullanılmış ve bitkileri enfeksiyondan korunduklarını tespit edilmiştir. Çalışmada kitinaz negatif halde kullanılan suşun fungal patojene karşı koruma kapasitesi bulunmadığı belirtilmiş ve fungal patojene karşı aktif özellik gösteren elementin kitinaz olduğu açık bir şekilde anlaşılmıştır. Böylelikle aktivitesi ve moleküler özellikleri uygun olan bir kitinaz geninin bitki büyümesini destekleyen bakterilere klonlanarak bitkinin gelişimini ve korunmasını artırabileceğini belirtmişlerdir.

Yuli *et al.* (2004), araştırmalarında Endonezya'da bulunan Tompaso sıcak su kaynağından kitinaz enzimi üreten bir bakterinin izolasyonunu sağlamışlardır. 16S rRNA sekans analiz sonuçlarına göre bu bakteri; Gram pozitif, spor üreten, çubuk şeklinde olup

Bacillus sp. 13.26 olarak isimlendirilmiştir. Elde edilen bakteri %5'lik kitin içeren besiyeri ortamında 72 saat 55°C'de üretildiğinde ekstrasellüler kitinaz üretmeyi başarmıştır. Enzim NH4SO4 (amonyum sülfat) çöktürme yöntemi ile saflaştırılmış ve saf enzim molekül kütlesi SDS-PAGE'de 60 kDa belirlenmiştir. Enzimin gelişme gösterdiği optimum sıcaklık 60°C ve optimum pH 7.8 olarak belirlenmiştir. Zimogram analizleriyle birlikte enzimin termal stabilitesi doğrulanmıştır. 80°C'de 1 saatlik inkübasyondan sonra enzim aktivitesinin önemli miktarda korunduğu bildirilmiştir.

Kuzu (2008), tarihli çalışmasında kitinaz enzimi üreten *Bacıllus* izolasyonunu, enzimin kısmi olarak saflaştırılmasını ve karakterize edilmesini gerçekleştirmiştir. Kitinaz üreten *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* HBK-51 suşu kitin ihtiva eden doğal ortamdan izole edilmiş, biyokimyasal ve morfolojik özellikleri ile birlikte yağ asiti ve 16S RNA dizi analizleriyle birlikte tanımlanması sağlanmıştır. *B. thuringiensis* HBK-51 suşunun kültür süpernatantından üretilen kitinaz, geniş bir pH (3.0-11.0) ve sıcaklık (30-120°C) aralığında aktivite göstermiş olup biyodegradasyonunda ve kitobioz üretilmesini içeren uygulamalarda kullanılabileceği bildirmiştir.

Chang *et al.* (2010), yılında yaptıkları çalışmada antifungal etkinliği bulunan kitinaz üreten bakterilerin izolasyonunu sağlamak için kullanılacak substrat olarak, karides ve yengecin işlenmesi sonucunda ortaya çıkan atık ürünleri kaynatıp homojen şekilde ezerek karides ve yengeç kabuğu tozu meydana getirmişlerdir. Topraktan izolasyonu sağlanan *Bacillus subtilis* NPU 001 suşu, kitinaz için birincil karbon kaynağı olan karides ve yengeç kabuğu tozunun %2'sini içeren ortamda geliştirmişlerdir. Kromotografik yöntemler ile saflaştırılan kitinazın (2 mg/ml^{-1}*), Fusarium oxysporum*'un hif çıkıntısını inhibe ettiği saptanmıştır. Bilinen bakteriyel kitinazlar ile karşılaştırıldığında 001 NPU'nun kitinazının, kolloidal yapıdaki kitinin enzimatik hidrolizi ile meydana gelen kitotrioz'un üretilmesi ve mantar bitki patojenlerine karşı antifungal aktivite göstermesi gibi kendine has özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir.

Bhattacharya *et al.* (2017), araştırmalarında *Bacillus pumilus* JUBCH08 suşunun fermantasyonunu etkileyen enzimin karakterizasyonu, saflaştırılması, uygulama değerleri ve bakterinin *Fusarium oxysporum*'a karşı antagonistik etkisinin tespiti hedeflenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında %0,5 kitin ve pH 8,0 ile desteklenmiş ortam 72 saat 35°C'de inkübasyona bırakıldığında en yüksek kitinaz üretim aktivitesi tespit edilmiştir. Enzimin Vmax ve Km değerleri sırasıyla 38.23 U/ml ve 0.13 mg/ml olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak *B. pumilus* JUBCH08'in kültürel koşulların kitinaz üretimini kuvvetli şekilde etkilediği, alkali koşullar altında ve sıcaklık karşısında iyi işlev gören kitinaz enzimi ilgili biyoteknolojik prosesler ve yem sanayisi için yararlı etki gösterebileceği söylenmiştir.

Vahed *et al.* (2013), azotlu asit tedavisi ve UV ışınlama kombinasyonunu kullanarak *Bacillus pumilus* SG2'nin mutajeni ile yüksek oranda kitinolitik aktivite ihtiva eden AV2-9 olarak adlandırılan bir mutant meydana getirdikleri çalışmada mutant suşta kitinazın termal stabilitesinde bir artış meydana geldiği belirlenmiştir.

Aziz *et al.* (2015), yapmış oldukları çalışmada fitaz enzimi üreten bakterilerin fiziko-kimyasal özelliklerini araştırmışlardır. Fitaz üreten bakteri izolatları, fosfat çözündürücü özelliğe sahip ortamlarda taranmıştır. *Lactobacillus casei, Enterobacter intermedius, Bacillus badius, Ecsherichia coli, Shigella spp.* ve *Klebsiella spp.* izolatlarının; PHY02, PHY03, PHY06, PHY07, PHY12 ve PHY30 sıralı bir şekilde morfolojik, mikroskobik ve biyokimyasal karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Bütün izolatların; PHY02, PHY03, PHY06, PHY07, PHY12 ve PHY30 aktiviteleri sırasıyla 37°C'de (27, 9, 19, 40, 19 ve 32 U/ml), pH 6,5'te (26, 15, 19, 41, 19 ve 32 U/ml) ve %1 NaCI (27, 15, 17, 41, 18 ve 32 U/ml) olarak belirlenmiştir.

Sümengen (2011), laktik asit bakterilerinden fitaz üretimi ve endüstriyel kullanım olanaklarını incelemek adına fermantasyonu tamamlanmış gıda ürünlerinden elde edilen *Lactobacillus sp.* türlerinden fitaz enziminin izolasyonu ve karakterizasyonu çalışmasını yapmışlardır. *Lactobacillus sp.* 12.1 ve *Lactobacillus sp.* 13.1'den izole edilen enzimler en yüksek aktiviteyi ihtiva etmeleri sebebiyle bu türler çalışmada kullanılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre, *Lactobacillus sp.* 12.1 ve 13.1'den izolasyonu sağlanan enzimin sahip olduğu karakteristiklerden dolayı endüstriyel alanda kullanımının uygun olduğu tavsiye edilmiştir.

Akçakoca (2014), topraktan izole ettiği *Bacillus sp.* suşlarından fitaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirmiştir. Türkiye'nin 30 farklı ilinden alınan toprak örneklerinden 300 adet bakterinin izolasyonu gerçekleştirmiştir. Bakterilerin fizyolojik ve morfolojik özellikleri araştırılarak 236 adetinin *Bacillus* cinsi olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak on dokuz *Bacillus sp.* suşu ekstraselüler fitaz üreticisi olarak tanımlanmıştır. Elde edilen verilere göre yeni fitaz enziminin geniş bir endüstriyel uygulama alanında kullanılabileceği raporlanmıştır.

Sandıkçıoğlu (2016), fitaz enzimi üretimi ve etkinliğinin araştırılması üzerine yapmış olduğu çalışmasında, ekstraselüler olarak *Aspergillus niger*'den sıvı besi ortamında üretilen fitaz enzimi, aseton çöktürmesi ve amonyum sülfat çöktürmesi uygulamaları yapılarak kısmı olarak saflaştırılmıştır. Yapılan uygulamalar sonucunda enzimin aktivitesi 16°C ve pH 3.5 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte enzimin geniş bir pH ve sıcaklık aralığında stabil olduğu ifade edilmiştir.

Dokuzparmak (2016), termofilik bir bakteri olan *Geobacillus sp.*'den yeni bir termostabil fitazın saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine yapmış olduğu çalışmasında,

Geobacillus sp.'den fitaz enziminin, yüksek ısı, Km ve Vmaks değerleri sırasıyla 1.31 mm ve 526,28 U olarak hesaplanmıştır. Edinilen bu sonuçlara göre, çalışmada gelişmiş özelliklere sahip alternatif bir fitaz enziminin meydana getirildiği ifade edilmiştir.

Tarakçıoğlu (2016), bakteri izolatlarının hücre duvarlarındaki farklılığın belirlenmesi amacıyla çalışmasında gram boyama testini uygulamıştır. Uygulamanın sonunda mikroskop altında incelenmiştir.

Barış (2009), yapmış olduğu çalışmasında katalaz enziminin varlığını tespit edebilmek adına katalaz testi uygulamıştır. Genellikle fakültatif olan veya aerobik solunum yapan mikroorganizmalarda bu enzim mevcuttur. Testin sonunda lam üzerinde oluşan kabarcıklar katalaz pozitif olarak değerlendirilmiş olup kabarcık görülmemesi katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir.

Dolapçı (2016), sitokrom oksidaz, oksidatif fosforilasyon yapan bakterilerin harcadıkları enzimi tespiti için oksidaz testi yapıldığını ifade etmiştir. 10–60 saniye içerisinde mor veya kahverengi-siyah bir renk oluşması testin pozitif olduğunu göstermektedir. Renk değişiminin olmadığı durumlar oksidaz negatif olarak değerlendirilmiştir.

Arda (1997), yapmış oldukları çalışmada nişasta hidrolizayonunu belirleyebilmek için nişasta hidrolizasyon aktivitesi ölçülecek bakteriden %1 oranında çözünür nişasta içeren agar üzerine ekim yapımışlardır ve bu ekim sonucu kültürler 35°C de 48 saat inkubasyona bırakılmıştır. Pozitif reaksiyonlarda koloni etrafında renksiz bir halka oluşurken, negatif durumlarda besiyeri mavi renkte görülür.

Saygılı (2006), mikroorganizmaların triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek amacıyla indol testini uyguladığı çalışmasında, mikroorganizmalar sıvı besiyerine veya peptonlu suya ekildikten sonra 37°C'de 1-5 gün inkubasyona bırakılmıştır. Tüplerin üst kısmında 1-2 dakika içerisinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyon ifade etmektedir. Sarımsı halkanın oluştuğu durumlar ise indolun oluşmadığını göstermektedir.

Xin *et al.* (2000), yapmış oldukları çalışmalarında nitratın nitrite indirgenmesi ve gaz oluşumunu gözlemleyebilmek için, %1 oranında KNO_3 içeren Durham tüpü bulunan Nutrient Broth besiyeri kullanmışlardır. 48 saatlik gelişmiş kültürlere %1 sülfanilik asit ve %0.6 α-naftilamin ayraçları ilave edilerek işlem gerçekleştirilecektir. Tüplerde meydana gelecek gaz oluşumu (N_2) denitrifikasyonu ifade etmiştir ve pozitif olarak kabul edilmiştir. Ayraçlar eklendikten 1-2 dakika sonra kırmızı rengin oluşması nitratların nitritlere kadar redükte olduğunu yani pozitif reaksiyonları ifade etmiştir.

Şenol (2014), yapmış olduğu çalışmasında kitinaz enzim aktivitesini ölçmek için 500 µL enzim çözeltisi ile 500 µL substrat vortekslenip homojen olarak karıştırılıp 30 dakika 37°C'de su banyosunda bekletilerek reaksiyona sokulmuştur. Örnekler spektrofotometre cihazında köre karşı (500 µL substrat +750 µL renklendirme çözeltisi + 1500 µL saf su) 540 nm'de ölçülerek aktivite değerleri hesaplanmıştır.

Sarıbuğa *vd.* (2014), yapmış oldukları çalışmada fitaz enzim aktivitesi ölçülürken her basamakta elde edilen süpernatantlardan aktivite tayini yapmışlardır. Fitaz enziminin aktiviteye sahip olduğu aralıklar sırasıyla tespit edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra elde edilen örnekler spektrofotometre cihazında 700 nm'de köre karşı ölçülmüştür.

MATERYAL VE METOD

Materyal

Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar

Alet-Ekipman	Marka
✓ Steril Kabin	ESCO/CLASS 2
✓ Steril Öze	ORLAB
✓ 15 mL'lik Cam Tüpler	TEKNİK CAM SANAYİ
✓ 40 mL'lik Cam Tüpler	TEKNİK CAM SANAYİ
✓ 15 mL'lik Ependorf Tüpleri	ISOLAB
✓ 50 mL'lik Ependorf Tüpleri	ISOLAB
✓ Santifrüf Tüpleri(2mL)	ISOLAB
✓ Lam	ORLAB
✓ Lamel	ORLAB
✓ Durham Tüpü	ORLAB
✓ Plastik Petri Plakları	ISOLAB
✓ Etüv	MEMMERT
✓ Çalkalamalı Etüv	GERHARDT
✓ UV- Spektrofotometre	SHIMADZU UV-1800 UV-VIV
✓ Santifrüf Cihazı	BECKMAN COULTER
✓ Magnetik Karıştırıcı(Isıtıcılı)	HEIDOLPH MR HEI STANDART
✓ Buzdolabı	ARÇELİK
✓ Cam Erlen(250 mL)	ISOLAB
✓ Cam Büret(100 mL)	ISOLAB
✓ Cam Beher(250 mL)	ISOLAB
✓ pH Metre	METTLER TOLEDO
✓ Hassas Terazi	SHIMADZU
✓ Otoklav	HİCLAVE HV-50 L
✓ Kar Makinesi	SCOTSMAN
✓ Plastik Kaplar	ZAMAN PLASTİK
✓ Otomatik Pipet(1 mL)	EPPENDORF
✓ Saf Su Cihazı	DIRECT-Q
✓ Su Banyosu	TERMAL

✓ Vorteks	IKA MS-3
✓ Cam Kavanoz	TEKNİK CAM SANAYİ
✓ Alüminyum Folyo	ISOLAB
✓ Mikroskop	ISOLAB

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal Malzeme	**Firma**
✓ Nutrient Agar	ACUMEDİA LAB
✓ Nutrient Broth	ACUMEDİA LAB
✓ Skim Milk Powder	LAB M
✓ Agaroz	SIGMA-ALDRICH
✓ Saf Su	DIRECT-Q
✓ Kristal Viyolet Boyası	MERCK
✓ Lügol Ayracı	MERCK
✓ Etil Alkol(%96)	ISOLAB
✓ Safranin Boyası	MERCK
✓ Sedir Yağı	MERCK
✓ Hidrojen Peroksit(H_2O_2)	MERCK
✓ Oksidase Reagent Kiti	HACH
✓ Nişasta	MERCK
✓ Tripton	LAB M
✓ Kovac's Ayracı	MERCK
✓ KNO_3	SIGMA-ALDRICH
✓ Sülfanilik Asit	MERCK
✓ α-naftilamin	SIGMA-ALDRICH
✓ Sukroz	SIGMA-ALDRICH
✓ HCl	ISOLAB
✓ NaOH	SIGMA-ALDRICH
✓ NaCl	SIGMA-ALDRICH
✓ 3,5-dinitrosalisilik asit	SIGMA-ALFRICH
✓ Kitin	SIGMA-ALDRICH
✓ Amonyum Sülfat(NH_4SO_4)	ISOLAB
✓ Sodyum Sitrat(C6H5Na3O7)	ISOLAB
✓ Sülfirik Asit(H_2SO_4)	ISOLAB
✓ Amonyum Molibdat((NH4)6Mo7O24.4H2O)	SIGMA-ALDRICH

- ✓ Demir Sülfat(FeSO4) SIGMA-ALDRICH
- ✓ Sodyum Asetat(C2H3NaO2) ISOLAB
- ✓ TCA(C2HCl3O2) ISOLAB
- ✓ Asetik Asit(CH_3COOH) ISOLAB
- ✓ Sodyum Fitat SIGMA-ALDRICH
- ✓ Sodyum Karbonat(Na_2CO_3) ISOLAB
- ✓ Tris(C4H11NO3) SIGMA-ALDRICH

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve hazırlanışları

Nutrient Agar: Hassas terazi içerisinde 28g/L olacak şekilde tartılan hazır Nutrient Agar tartılmış ve tartılan miktar 1 L distile H_2O içerisinde karıştırılarak iyice çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan karışımın ağzı steril alüminyum folyo ile kapatılarak 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavda sterilizasyona bırakılmıştır. Sterilizasyon sonucu alınan örnek 45°C dolaylarında plastik petri plaklarına dökülmüştür.

Nutrient Broth: Hassas terazi içerisinde 13g/L olacak şekilde hazır Nutrient Broth tartılmış ve tartılan miktar 1 L distile H_2O içerisinde karıştırılarak iyice çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan karışım 15 mL'lik cam tüplere eşit olarak paylaştırılıp cam kavanozlar içerisinde 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavda sterilizasyona bırakılmıştır. Sterilizasyon sonucu alınan cam tüpler 4°C'lik buzdolabında bekletilmiştir.

Skim Milk Agar: Skim Milk Agar hazırlanırken ilk olarak Skim Milk Powder 20g/L şeklinde hassas terazide tartılıp erlen içerisine dökülmüştür. Sonrasında katılaşmayı sağlamak amacıyla 1g/L olacak şekilde agaroz tartılıp Skim Milk Powder üzerine eklenmiştir. Karışım distile H_2O ile 1 L'ye tamamlanarak erlenin ağzı alüminyum folyo ile iyice sarılarak 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavda sterilizasyona bırakılmıştır. Sterilizasyon sonucu alınan örnek 45°C dolaylarında plastik petri plaklarına dökülmüştür.

%1 Oranında Çözünür Nişasta İçeren Nutrient Agar: Nutrient Agar hazırlama aşamaları benzer şekilde takip edilmiştir. Otoklavdan önce hacimce %1 çözünür nişasta hassas terazide tartılıp NA içerisine ilave edilmiştir.

%1 Tripton İçeren Nutrient Broth: Nutrient Broth hazırlama aşamaları benzer şekilde takip edilmiştir. Otoklavdan önce hacimce %1 Tripton hassas terazide tartılıp NB içerisine ilave edilmiştir.

%0.5, %15 ve %60 Sukroz İçeren Nutrient Agar: Nutrient Agar hazırlama aşamaları benzer şekilde takip edilmiştir. %0.5 sukrozlu NA için otoklavdan önce 0.5g/mL, %15'lik için 15g/mL, %60'lık için ise 60g/mL sukroz hassas terazide tartılıp NA içerisine ilave edilmiştir.

%1 Oranında KNO_3 İçeren Nutrient Broth: Nutrient Broth hazırlama aşamaları benzer şekilde takip edilmiştir. Otoklavdan önce hacimce %1 oranında KNO_3 hassas terazide tartılıp NB içerisine ilave edilmiştir.

Çalışmada kullanılan çözeltilerin, tamponların ve substratların hazırlanması

%5'lik Hidrojen Peroksit(H_2O_2) Çözeltisi: Hacimce %5'lik H_2O_2 hazırlamak için 50 mL'ye göre işlem yapılmıştır. 42.48 mL distile H_2O üzerine 7.52 mL H_2O_2 ilave edilmiştir.

%1 Sülfanilik Asit Çözeltisi: 100 mL'ye göre işlem yapılmıştır. Hassas terazide 1g sülfanilik asit tartılarak 100 mL distile H_2O içerisinde çözündürülmüştür.

%0.6'lık α- naftilamin Çözeltisi: 100 mL'ye göre işlem yapılmıştır. Hassas terazide 0.6 gr α-naftilamin tartılarak 100 mL distile H_2O içerisinde çözündürülmüştür. α-naftilamin kimyasalının suda çözünürlüğü oldukça düşük olduğundan magnetic karıştırıcıda uzun süre karıştırılmıştır.

%96'lık Etil Alkol Çözeltisi: 96 mL saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

%0,85'lik NaCl(FTS) Çözeltisi: 1 L saf su içerisinde 0,85 g NaCl çözündürülmüştür. Elde edilen çözelti otoklavda steril edilmiş ve böylelikle kullanılmıştır.

%96' lık Sülfirik Asit Çözeltisi: 96 mL sülfirik asitin hacmi steril distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Kitinaz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılacak Substratın Hazırlanışı: 0,02 M Sodyum Sitrat çözeltisi içerisine %0,05 oranında kitin ilave edilerek elde edilmiştir. Çözelti içeriğinde bulunan Sodyum Sitrat tamponu 5,88 g Sodyum Sitratın tartılıp, distile su ile 100 mL'ye tamamlanmasıyla elde edilmiştir. Substratın pH'sı 6,0'ya HCl ile ayarlanmıştır.

Kitinaz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılacak Renklendirme Çözeltisinin Hazırlanışı: Renklendirme çözeltisi için 0,01 M'lık DNSA çözeltisi hazırlanmıştır. Saf su içerisinde 3,5-dinitrosalisilik asit çözündürülerek DNSA hazırlanmıştır.

Fitaz Aktivitesi Tayininde Kullanılacak Substratın Hazırlanışı: 100 mL 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 5,5) içerisine 2 *m*M Sodyum fitat ilave edilerek substrat hazırlanmıştır. 0,1 M'lık Sodyum asetat tamponu 0,82 g sodyum asetatın 100 mL distile su içerisinde çözündürülüp HCl ile pH 5,5'e ayarlanmasıyla elde edilmiştir. Sonrasında hassas terazide 0,132 g sodyum fitat tartılıp, Sodyum asetat tamponu üzerine eklenmiştir. Reaksiyonu durdurmak için %10'luk TCA çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti 100 mL distile su içerisinde 10 g TCA çözündürülmesiyle hazırlanmıştır (Işık 2017).

Fitaz Aktivitesi Tayininde Kullanılacak Renklendirme Çözeltisinin Hazırlanışı: Renklendirme çözeltisi hazırlanırken A, B ve C olmak üzere 3 farklı çözelti hazırlanmıştır.

- ✓ A: 93,7 mL distile suya 5,73 mL %96' lık sülfirik asit ilave edilmiş ve %5,5 (V/V) sülfirik asit çözeltisi hazırlanmıştır.
- ✓ B: 2,5 g amonyum molibdat, uygun miktarda A çözeltisi ile çözündürülmüş ve son hacim A çözeltisiyle 100 mL olarak ayarlanmıştır.
- ✓ C: 2,5 g demir sülfat, uygun miktarda distile su ile çözündürülmüş ve son hacim distile su ile 100 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Son olarak içerisine 1-2 damla sülfirik asit katılmıştır.

B ve C çözeltileri, 4 hacim B: 1 hacim C olmak üzere karıştırılmış ve renklendirme çözeltisi elde edilmiştir (Işık 2017).

Optimum pH Aktivite Tayini İçin Kullanılan Tampon Çözeltiler:

Sodyum Asetat Tamponunun Hazırlanışı: pH 2.0-3.0 aralığındaki kitinaz aktivitesini tespit etmek amacıyla bu tamponlar kullanılmıştır. 0,82 g sodyum asetat tartılmış ve içerisine 10g/L olacak şekilde kolloidal kitin ilave edilerek distile H_2O ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. pH değerini ayarlayabilmek için NaOH ya da HCI kullanılmıştır.

Sodyum Sitrat Tamponunun Hazırlanışı: pH 4.0, 5.0, 6.0 aralıklarının kitinaz aktivitesini tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. Tamponu hazırlarken 2.8 g sodyum sitrat tartılmış ve içerisine 10g/L olacak şekilde kolloidal kitin ilave edilerek distile H_2O ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. pH değerini ayarlayabilmek için NaOH ya da HCI kullanılmıştır.

Tris-HCl Tamponunun Hazırlanışı: pH 7.0, 8.0, 9.0 aralıklarının kitinazın aktivitesini tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. 0,121 g Trizma base tartılmış ve içerisine 10g/L olacak şekilde kolloidal kitin ilave edilerek distile H_2O ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. pH değerini ayarlayabilmek için NaOH ya da HCI kullanılmıştır.

Sodyum Karbonat Tamponunun Hazırlanışı: pH 10.0, 11.0 aralıklarının kitinazın aktivitesinin tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. 0,105 g sodyum karbonat tartılmış ve içerisine 10g/L olacak şekilde kolloidal kitin ilave edilerek distile H_2O ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. pH değerini ayarlayabilmek için NaOH ya da HCI kullanılmıştır.

Yöntem

Atık sudan izole edilmiş olan *E. acetylicum* Atatürk Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Prof. Dr. Neslihan Dikbaş Kültür Koleksiyonundan (ND 50) alınarak Nutrient Agar (NA) da 35°C'de 48 saat inkübasyona

bırakılmıştır. Oluşan kolonilerden bir öze dolusu alınarak Nutrient Broth'a (NB) aktarılacak ve 35°C'de 200 rpm'de 48 saatlik kültür alınıp diğer işlemlerde kullanılmıştır.

Biyokimyasal Özelliklerin Tespit Edilmesi

Gram Boyama

Bakteri izolatları hücre duvarlarındaki farklılığın tespit edilmesi amacıyla gram boyama testine tabii tutulmuşlardır. Bu kapsamda ilk olarak olarak lam üzerine bir damla saf su damlatılmıştır ve üzerine besiyeri ortamında 24 saat geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu alınıp iyice yayılmıştır. Ardından ateşten geçirilerek fiksasyonu sağlanmıştır. Daha sonra ilk olarak kristal viyolet boyası ile 1 dk muamele edildi ve saf su ile 30 s süre ile yıkanmıştır. Ardından lügol ayracı ile 1 dk süre ile muamele edildi ve %96 saflıktaki etil alkol ile yıkanmıştır. Yeniden saf sudan geçirilerek son kez safranin boyası ile muamele görmüştür. Sonrasında lam üzerindeki preparat yıkanıp kurutulmuştur. Bu aşamadan sonra lam mikroskop altında incelenmiştir. İnceleme sonunda mor renkli görünüm Gram pozitif, pembe renkli görünüm ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Tarakçıoğlu, 2016).

Katalaz testi

Bu analiz için inkübasyonu tamamlanan test suşlarından bir öze dolusu alınmıştır ve üzerinde %5'lik hidrojen peroksit damlası bulunan lam üzerine iyice yayılarak homojen karışması sağlanmıştır. Yapılan işlem sonucunda hava kabarcığı oluşturan bakteriler katalaz pozitif, oluşturmayanlar ise katalaz negatif olarak kabul edilmiştir (Arslan, 2017; Albayrak, 2018)

Oksidaz testi

Analiz için 'Oksidase Reagent' isimli hazır bir kit kullanılmıştır. Nutrient Agarlarda inkübasyonu tamamlanmış bakteriler üzerine bu kit 2-4 damla ilave edilmiştir. 5 dakikalık bekleme süresi ardından bakterilerde gözlemlenen mavi-mor renk oksidaz pozitifliği, renkte değişim meydana gelmemesi ise oksidaz negatifliği ifade etmiştir (Sarı, 2016; Albayrak, 2018).

Nişasta hidrolizasyon testi

Nişasta hidrolizasyon aktivitesi testinde inkübasyonu tamamlanmış bakteri %1 oranında çözünür nişasta içeren Nutrient Agara ekilerek ve 35°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonunda agarların üzeri lugol ayıracı ile kaplanmıştır. Pozitif reaksiyonlarda, koloni etrafında renksiz bir halka oluşurken negatif reaksiyonlarda ise besiyerinde mavi renk oluşumu gözlemlenmektedir (Arda, 1997).

Kazein hidrolizasyon testi

Bakteri hazırlanmış olan Skim Milk Agara ekilmiş ve 35°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandığında kolonilerin çevresinde oluşan açık alan, pozitif reaksiyonları ifade etmektedir. Negatif reaksiyonlarda ise koloni çevresi hafif opaklaşmış şekilde görülmektedir (Arda, 1997).

İndol testi

%1 oranında Tripton içeren NB besiyerinde inkübasyonu tamamlanmış kültürler üzerine 0.5 mL Kovac's ayracı eklenmiş ve homojen olarak karışımı sağlanmıştır. Uygulama sonunda 1-2 dakika içerisinde tüplerin üst kısmında kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyonu, oluşan sarımsı halka ise negatif reaksiyonu ifade etmektedir (Arda, 1997).

Nitrat redüksiyon testi

Nitrat redüksiyonunun belirlenmesi için yapılmış olan testte içlerinde Durham tüpü bulunan NB besiyerleri kullanılmıştır. İnkübasyonu tamamlanan NB besiyerleri içerisine %1 sülfanilik asit ve %0.6 α-naftilamin ayraçları eklenmiştir. Ayraçlar eklendikten 1-2 dakika sonra kırmızı rengin meydana gelmesi nitratların nitritlere kadar redükte olduğunu yani pozitif reaksiyonları ifade etmektedir (Arda, 1997; Xin *vd*. 2000).

Şeker tolerans testi

% 0.5, % 15.0 ve % 60.0 oranlarında sukroz ihtiva eden NA besiyerleri hazırlanmış ve aseptik koşullarda petri plaklarına aktarılmıştır. 35°C'de 48 saatlik inkübasyonları tamamlanan petriler değerlendirilmiştir. Petri plaklarında bulunan her bir inokülasyon hattındaki mikroorganizma gelişiminin boyutsal genişliği mm cinsinden ölçülüp kaydedilmiştir. Gelişim olmayan plaklar sıfır olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 1994).

***E. acetylicum'*un gelişme gösterdiği ekstrem koşulların belirlenmesi**

E. acetylicum'un gelişme gösterdiği ekstrem ph aralıklarının belirlenmesi

E. acetylicum'un gelişim gösterdiği ekstrem ve optimum pH aralıklarının tespit edilmesi amacıyla, farklı pH değerlerinde (pH; 3,5 7, 9, 11) hazırlanmış NA ve NB sıvı besiyerine bakteri inokülasyonu sağlanmıştır. NB içeren tüpler 35 ^{o}C'de 200 rpm'de 48 saat inkübasyona bırakılmış olup, NA besiyerleri ise 35 ^{o}C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında test tüpleri ve spektrofotometre cihazında ($_{OD540}$) köre karşı (NB) ölçümü yapılmış, katı besiyerlerindeki gelişim ise oluşan koloniler sayılarak kob/mL cinsinden

hesaplanmıştır. Bu değerlendirme sonucu *E. acetylicum*'un gelişim gösterdiği ekstrem pH aralıkları tespit edilmiştir (Arslan, 2017).

E. acetylicum'un gelişme gösterdiği ekstrem sıcaklık aralıklarının belirlenmesi

E. acetylicum'un gelişim gösterdiği ekstrem ve optimum sıcaklık aralıklarının tespit edilmesi amacıyla, bakteri NA ve NB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Ardından farklı sıcaklık değerlerine ayarlı (5°C, 15°C, 25°C, 35°C, 45°C, 55°C ve 65°C) etüvlerde tüpler 200 rpm'de 48 saat, petriler ise 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnlübasyon süresi tamamlandığında NB sıvı besiyerindeki bakterilerin gelişebildiği sıcaklık aralıkları spektrofotometrede ($_{OD540}$) köre karşı (NB) yapılan ölçümler sonucunda belirlenmiştir. Katı besiyerindeki gelişimde ise oluşan koloniler sayılıp kob/mL cinsinden hesaplanmıştır (Baltacı, 2015).

E. acetylicum'un gelişme gösterdiği ekstrem tuz konsantrasyonlarının belirlenmesi

E. acetylicum'un gelişme gösterdiği ekstrem tuz konsantrasyonlarının tespit edilmesi amacıyla farklı tuz konsantrasyonları (%2, %4, %6, %8, %10, %12) ihtiva eden NA ve NB besiyerlerine bakterilerin ekimi gerçekleştirilmiştir. NB sıvı besiyelerinin bulunduğu tüpler çalkalamalı etüvlerde 200 rpm'de 48 saat, petriler ise normal etüvlerde 35 ^{o}C'de 48 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. NB sıvı besiyerindeki bakterilerin gelişebildikleri tuz konsantrasyonları spektrofotometrede ($_{OD540}$) köre karşı (NB) yapılan ölçümler sonucunda belirlenmiştir. Katı besiyerindeki gelişimde ise oluşan koloniler sayılıp kob/mL cinsinden hesaplanmıştır (Albayrak, 2018).

***E. acetylicum*'dan kitinaz enziminin saflaştırılması, enzim aktivitesinin ölçülmesi**

Kolloidal kitin hazırlanması

10 g kitinin üzerine 150 mL konsantre HCl çözeltisi ilave edilmiş ve ısıtıcı özelliği mevcut manyetik karıştırı yardımıyla 30°C'de 1 saat kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Çökeltinin pH değeri 7,00'a ulaşıncaya kadar 2-3 L 4 °C'lik distile su ile yıkanmıştır. Çökeltilmiş koloidal kitin eldesi için her yıkamadan sonra 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. pH metre ile yapılan ölçümler sonucu istenilen değere ulaşılıp çökeltilmiş kolloidal kitin örnekleri kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır (Lisa *et al.* 2017).

Kitinaz enziminin üretim optimizasyonunun belirlenmesi

Kitinaz enziminin optimizasyonu Lisa *et al.* (2017)'ye göre modifiye edilerek yapılmıştır. Kullanılan NB besiyerlerine farklı miktarlarda (0-5-10-15 g/L olacak şekilde)

kollodial kitin katılmış ve bakteri inokülasyonu sağlanmıştır. Bakterilerin bu besiyerlerine inokülasyonu sağlanmış, 2 gün boyunca 35 °C'de, 200 rpm'de inkübe edilmiştir. 6 saatte bir alınan örneklerin bakteri ölçümü yapılmış ve *E. acetylicum*'un gelişme grafiği oluşturulmuştur. Ardından kültürler 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir ve supernatant kısmı kitinaz tahlili için kullanılmıştır. Aktivitenin her 6 saatte bir ölçülmesiyle kitinaz üretiminin pik yaptığı zaman grafiklerin çizilmesiyle tespit edilmiştir. Ölçümler sırasında en iyi substrat konsantrasyonunu belirlemek için farklı miktarlarda kolloidal kitin konsantrasyonları (5-10-20 g/L) çalışılmış ve optimum konsantrasyon belirlenmiştir.

E. acetylicum'un gelişme grafiğinin oluşturulması

Çalışmanın bu aşamasında ilk olarak *E. acetylicum* NA da 35°C'de 48 saat geliştirilmiştir. Ardından gelişen kültürden bir öze dolusu koloni alınmış ve farklı miktarlarda kollodial kitin içeren (0-5-10-15 g/L) Nutrient Broth besiyerlerine inokülasyonu sağlanmıştır. İnokülasyon sonucu örnekler 35 °C'de, 200rpm de 2 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Her 6 saatte bir alınan örnekler % 0,85'lik NaCl(FTS) çözeltisi ile on kat seyreltilmiş ve spektrofotometrede ($_{OD540}$) köre karşı (NB) ölçülmüştür. Zamana karşı OD değerlerinin kullanıldığı grafiklerde *E. acetylicum*'un gelişme grafiği oluşturulmuştur (Kılınç 2018).

Kitinaz enziminin saflaştırılması

E. acetylicum'un hazırlanmış olan NB besiyerine inokülasyonu sağlandıktan sonra optimizasyon sonucu belirlenmiş olan süre ve sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Ardından +4°C'de 48 saat bekletilmiş ve 9000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj işlemine tabii tutulmuştur. Santrifüjleme sonrasında süpernatant ve çökelti kısımları birbirinden ayrılarak süpernatant kısmı ile işleme devam edilmiştir. Enzimin çöktüğü amonyum sülfat doygunluk aralığını (0-20, 20-40, 40-60, 60-80) belirlemek amacıyla gerekli amonyum sülfat miktarı önceden belirlenmiş formül ile hesaplanarak bulunmuş ve kitinaz için her amonyum sülfat doygunluk aralığında çökelti ve süpernatant kısmında enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu aralık kitinazın amonyum sülfat doygunluk aralığı olarak kabul edilmiş ve enzim aktivitesinin ölçülmesinde bu aralıktan yararlanılmıştır (Kırıcı *vd.* 2016).

Kitinaz enzim aktivitesinin ölçülmesi

Enzim aktivitesi ölçülürken ilk olarak renklendirme çözeltisi ve gerekli substrat hazırlanmıştır. Renklendirme çözeltisi olarak 0,01 M DNSA çözeltisi, substrat olarak ise optimizasyon sonucu belirlenen konsantrasyonda kolloidal kitin içeren 0,02 M Sodyum sitrat çözeltisi kullanılmıştır. Gerekli çözeltilerin hazırlanmasının ardından en yüksek amonyum

sülfat doygunluk aralığı belirlenen örnekten 500 µL enzim çözeltisi alınıp üzerine 500 µL substrat ilave edilmiştir. Vortekslenip homojen olarak karıştırılan örnek 30 dakika 37°C'de su banyosunda bekletilerek reaksiyona sokulmuştur. Su banyosundan çıkarılan tüplere 750 µL renklendirme çözeltisi eklenmiş ve sonrasında 10 dakika 80°C'de su banyosunda bekletilerek reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Su banyosundan alınan örneklerin üzerine 1300 µL distile su ilave edilmiştir. Örnekler spektrofotometre cihazında köre karşı (500 µL substrat +750 µL renklendirme çözeltisi + 1500 µL saf su) 540 nm'de ölçülmüş ve aktiviteleri hesaplanmıştır (Şenol 2014).

Kitinaz enziminin optimum ph değerinin belirlenmesi

Enzimin optimum pH değerini belirleyebilmek amacıyla aktivite ölçümü sonucu belirlenen konsantrasyonda kollodial kitin içeren substrat çözeltileri farklı pH değerlerine sahip (pH 2,0-11,0) tamponlar kullanılarak hazırlanmıştır. Substratlar hazırlanırken sodyum asetat (pH 2,0-3,0) tamponu, sodyum sitrat (pH 4,0-6,0) tamponu, Tris-HCl (pH 7,0-9,0) tamponu ve sodyum karbonat (pH 10,0-11,0) tamponu kullanılmıştır.

Aktiviteyi belirleyebilmek amacıyla en yüksek amonyum sülfat doygunluk aralığı belirlenen örnekten 200 µL enzim çözeltisi alınmış üzerine 500 µL substrat ilave edilerek vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından 30 dakika süre ile optimizasyon sonucu belirlenen sıcaklığa ayarlanmış benmaride reaksiyona sokulmuştur. Su banyosundan çıkarılan tüplere 750 µL renklendirme çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika 80°C'ye ayarlı su banyosunda bekletilerek reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Son aşamada üzerine 1300 µL distile saf su koyulup 540 nm'ye ayarlı spektrofotometrede köre karşı ölçülmüştür. Elde edilen değerler grafiğe dökülerek değerlendirilmiştir (Şenol 2014).

Kitinaz enziminin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirleyebilmek amacıyla 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C'lik sıcaklıklar seçilmiştir. Sıcaklık ölçümlerinin saptanması için su banyosu veya inkübatörler kullanılmıştır. Aktiviteyi belirleyebilmek amacıyla en yüksek amonyum sülfat doygunluk aralığı belirlenen örnekten 200 µL enzim çözeltisi alınmış üzerine 500 µL substrat ilave edilerek vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından 30 dakika süre ile optimizasyon sonucu belirlenen sıcaklığa ayarlanmış benmaride reaksiyona sokulmuştur. Su banyosundan çıkarılan tüplere 750 µL renklendirme çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika 80°C'ye ayarlı su banyosunda bekletilerek reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Son aşamada üzerine 1300 µL distile saf su koyulup 540 nm'ye ayarlı spektrofotometrede köre karşı ölçülmüştür. Elde edilen değerler (EU/mL) grafiğe dökülerek değerlendirilmiştir (Şenol 2014).

Exiguobacterium acetylicum'un fitaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Exiguobacterium acetylicum Nutrient Broth sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve optimizasyon sonucundan belirlenmiş değerler olan 35°C'de 48 saat süre ile steril etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Fitaz enzim aktivitesini belirleyebilmek amacıyla çalışmada ilk olarak aktivite tayininde kullanılmak üzere renklendirme çözeltisi ve enzim için gerekli substrat hazırlanmıştır. Kullanılacak substrat 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 5,5) içerisine 2 mM Sodyum fitat ilave edilerek hazırlanmıştır. Renklendirme çözeltisi ise tezin materyal kısmın ifade edildiği gibi hazırlanmıştır.

İnkübasyonu tamamlanan bakterinin, çökelti ve süpertnatant fazlarının ayrımını sağlamak amacıyla 10.000 rpm'de 10 dakika santifrüj işlemi uygulanmıştır. Aktivite tayininde süpernatant fazdan alınan 100 µL enzim çözeltisinin üstüne 250 µL substrat eklenmiş ve sonra vorteks cihazı yardımıyla karıştırılmıştır. Ardından 10 dakika süre ile 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilerek reaksiyona sokulmuştur. Tüpler 15 dk oda sıcaklığında bekletilip üzerlerine 500 µL renklendirme çözeltisi ilave edilmiştir. 15 dakika beklenildikten sonra 3200 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüjün ardından elde edilen örnekler 700 nm'ye ayarlı spektrofotometre cihazında köre karşı ölçülerek sonuçlar grafiğe dökülmüştür (Sarıbuğa *vd.* 2014).

ARAŞTIRMA BULGULARI

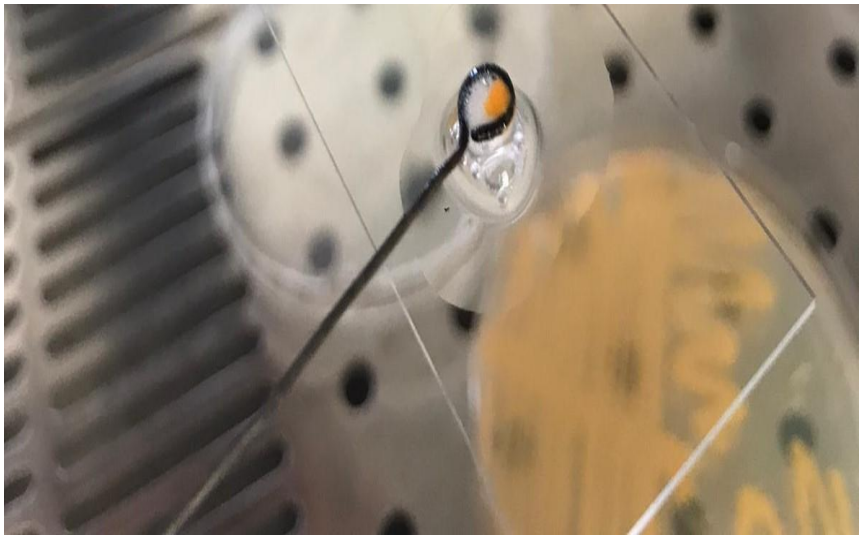
Atık sudan izole edilmiş olan *E. acetylicum* Atatürk Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı Prof. Dr. Neslihan Dikbaş Kültür Koleksiyonundan (ND 50) alınarak Nutrient Agar (NA) da 35°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve oluşan kolonilerden bir öze dolusu alınarak Nutrient Broth'a (NB) aktarılmış ve 35°C'de 200 rpm'de 48 saatlik kültürler diğer işlemlerde kullanılmıştır.

Biyokimyasal Testler Sonucunda Elde Edilen Bulgular

Bakteriye inkübasyon süresi sonunda gram boyama testi uygulanmıştır. Test sonucu oluşması beklenen mor renkli görünüm gram pozitif, pembe renkli görünüm ise gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Tarakçıoğlu, 2016).

Gram boyama işlemi sonucu bakteri mor renk olarak görülmüş gram (+) olarak değerlendirilmiştir.

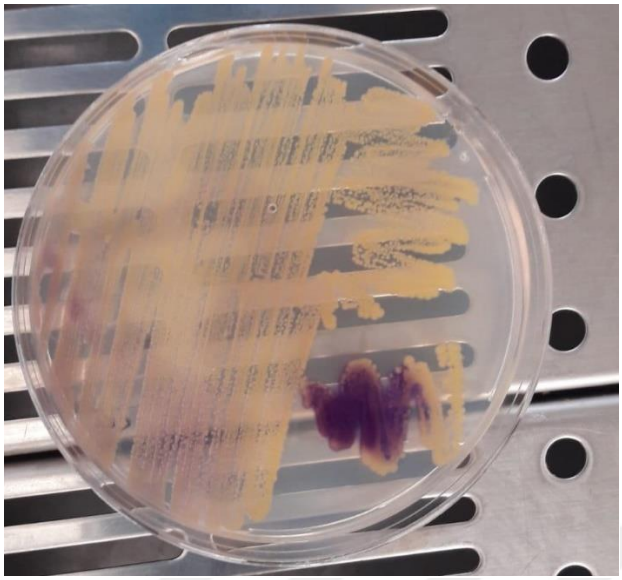
Yapılmış olan katalaz testi sonucunda hava kabarcığı oluşturan bakteriler katalaz pozitif, oluşturmayanlar ise katalaz negatif olarak kabul edileceği bildirilmiştir (Arslan, 2017; Albayrak, 2018). Şekil 12'de gözlemlenen kava habarcıkları *E. acetylicum*'un katalaz pozitif olduğunu belirtmiştir.



Şekil 12. *E. acetylicum*'un katalaz testi sonucu

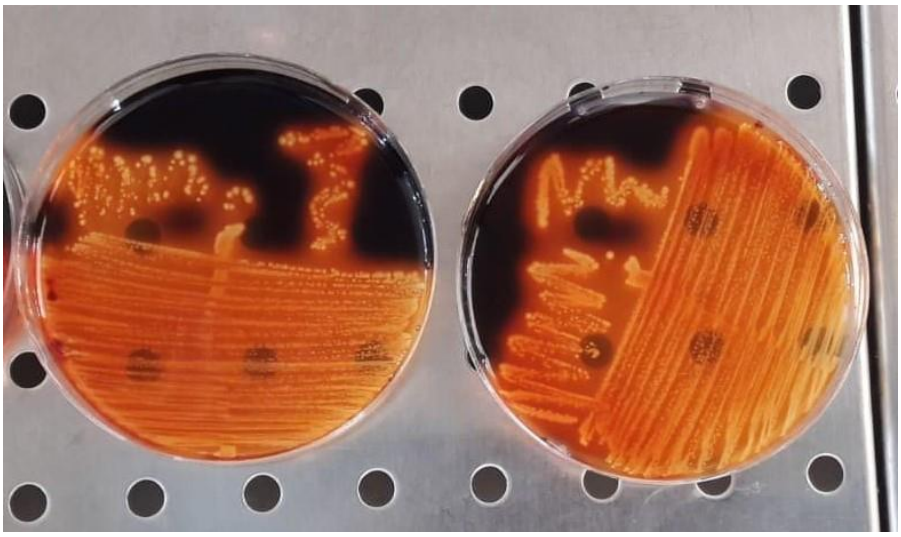
Oksidaz testinde, uygulama sonrası 5 dakikalık bekleme süresi ardından gözlemlenen mavi-mor renk oluşumu oksidaz pozitif reaksiyonları, renkte değişim meydana gelmemesi ise oksidaz negatif reaksiyonları ifade edeceği bildirilmiştir (Sarı, 2016; Albayrak, 2018). Şekil

13’de gözlemlenen mavi-mor renk oluşumu mikroorganizmanın oksidaz pozitif özellik gösterdiğini göstermektedir



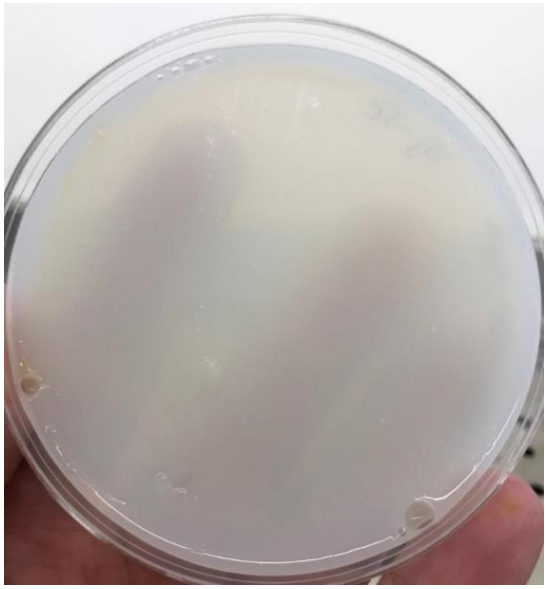
Şekil 13. *E. acetylicum*’un oksidaz testi sonucu

Nişasta hidrolizasyon testi sonucu oluşabilecek koloni etrafında renksiz halka pozitif reaksiyonları, NA üzerinde oluşacak mavi renk oluşumu ise negatif reaksiyonları ifade edeceği bildirilmiştir (Arda, 1997). Şekil 14’de gözlemlenen koloni etrafındaki renksiz halkalar mikroorganizmanın nişastayı hidrolize edebildiğini, yani reaksiyonun pozitif olduğunu ifade etmektedir.



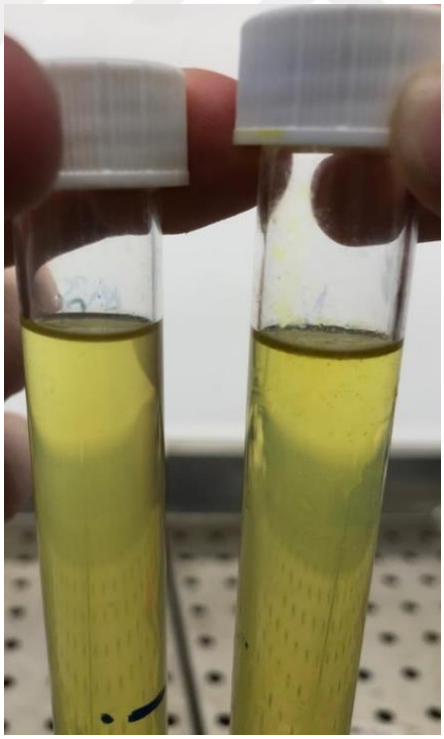
Şekil 14. *E. acetylicum*’un nişasta hidrolizasyon testi sonucu

Kazein hidrolizasyon testinde kolonilerin çevresinde oluşan açık alan pozitif reaksiyonları, koloni çevresinin hafif opaklaşmış görünümü ise negatif reaksiyonları ifade edeceği bildirilmiştir (Arda, 1997). Şekil 15’de gözlenlenen koloni etrafının hafif opaklaşmış görünümü test sonucunun negatif olduğunu ifade etmiştir.



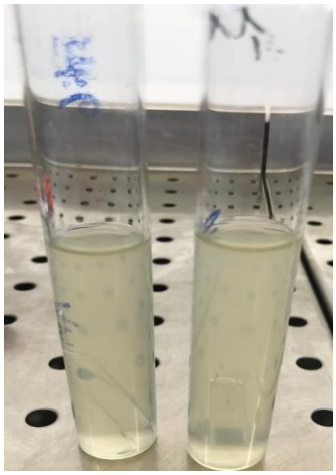
Şekil 15. *E. acetylicum*'un kazein hidrolizasyon testi sonucu

İndol testi yapılırken, uygulama bittikten sonra 1-2 dakika içerisinde tüplerin üst kısmında kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyonu, oluşan sarımsı halka ise negatif reaksiyonu ifade edeceği bildirilmiştir (Arda, 1997). Şekil 16'da tüplerin üst kısımlarında gözlemlenen sarımsı halka indol testinin negatif sonuçlandığını ifade etmiştir.



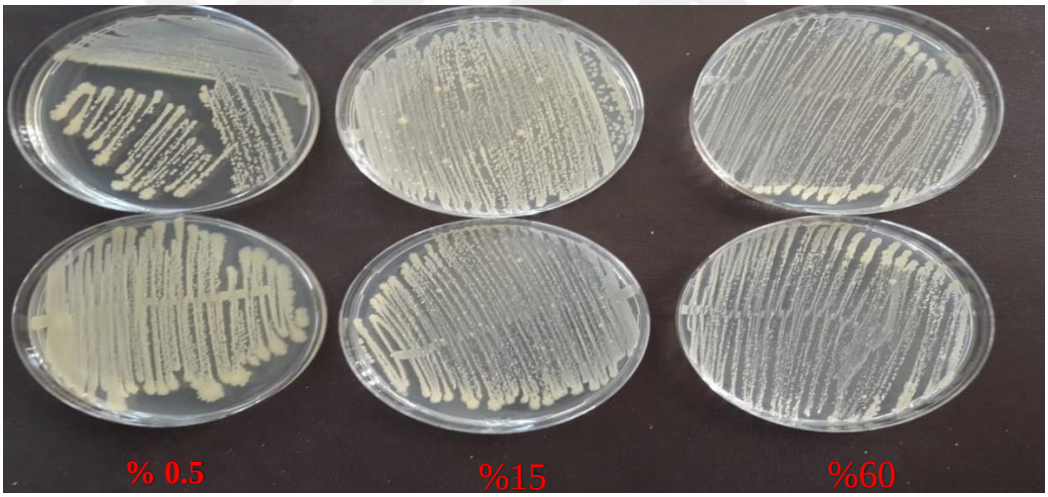
Şekil 16. *E. acetylicum*'un indol testi sonucu

Nitrat redüksiyon testinde, ilgili ayraçların eklenmesinin 1-2 dakika sonrası kırmızı rengin meydana gelmesi nitratların nitritlere kadar redükte olduğunu yani pozitif reaksiyonları ifade edeceği bildirilmiştir (Arda, 1997; Xin *vd.* 2000). Şekil 17'de tüplerin renginde bir değişim meydana gelmediği, yani reaksiyonun negatif sonuçlandığı gözlemlenmektedir



Şekil 17. *E. acetylicum*'un nitrat redüksiyon testi sonucu

Şeker tolerans testinde mikrooraganizmanın değişik konsantrasyonlarda sukroz içeren (%0.5, %15, %60) NA besiyerlerinde geliştirilmesinin ardından gelişme hattının genişliği mm cinsinden ölçülerek kaydedilmiştir (Temiz, 1994). Uygulama sonrası elde edilen Şekil 18'de gelişme hatlarından yararlanılarak *E. acetylicum*'un yüksek şeker konsantrasyonlarına dayanıklı bir tür olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 18. *E. acetylicum*'un şeker tolerans testi sonucu

Tablo 3. Biyokimyasal testlerin sonuçları

Biyokimyasal Test	Testin Sonucu
Gram Boyama	Gram (+)
Katalaz Testi	Katalaz (+)
Oksidaz Testi	Oksidaz (+)
Nişasta Hidrolizasyon Testi	Nişasta Hidrolizasyon (+)
Kazein Hidrolizasyon Testi	Kazein Hidrolizasyon (-)
İndol Testi	İndol (-)
Nitrat Redüksiyon Testi	Nitrat Redüksiyon (-)
Şeker Tolerans Testi	%60 oranında şekere toleranslı

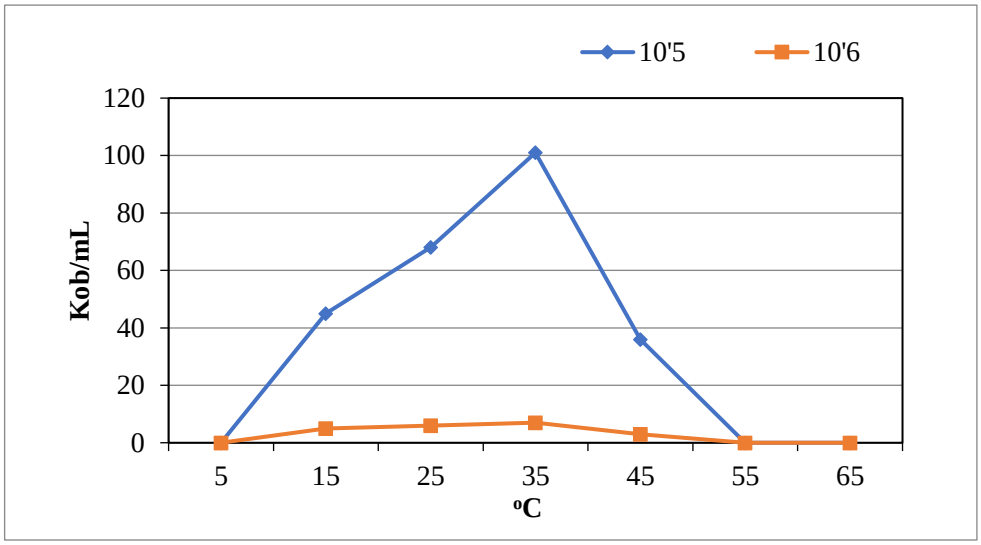
E. acetylicum'un Ekstrem Gelişim Gösterdiği Koşulların Tespit Edilmesi ve Bulguların Değerlendirilmesi

E. acetylicum 35°C sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübe edildikten sonra % 0.85'lik FTS'lerde 10^{-5} ve 10^{-6} değerlerine kadar seyreltilip böylelikle katı ve sıvı besi ortamlarında geliştirilmiştir. Ekstrem pH ve tuz konsantrasyonunun belirlenmesinde farklı pH değerlerine ve tuz konsantrasyonlarına sahip NA ve NB besiyerleri kullanılmıştır. NA besiyerinde gelişimi sağlanan mikroorganizmalar koloni sayımı yapılarak, NB besiyerinde gelişimi sağlanan mikroorganizmalar ise OD_{540} absorbansa ayarlanmış spektrofotometre cihazında köre karşı ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bu değerler NA için kob/mL olarak, NB için ise cfu/mL olarak verilmiştir. *E. acetylicum*'un ekstrem sıcaklık koşullarının belirlenmesinde inokülasyonu tamamlanan NA ve NB besiyerlerleri farklı sıcaklık değerlerine ayarlı (5°C, 15°C, 25°C, 35°C, 45°C, 55°C ve 65°C) etüvlerde tüpler 200 rpm'de 48 saat süreyle, petriler ise 48 saat süreyle inkübe edilmişlerdir.

NA besiyerinde sayımı yapılan örneklerin ekstrem sıcaklık sayım sonuçları tablo ve grafik kullanılarak ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda en iyigelişme gösterdiği sıcaklık değeri 35°C olarak belirlenmiştir.

Tablo 4. *E. acetylicum*'un farklı sıcaklıklarda (°C) sayım sonuçları

Sıcaklık (°C)	Sayım Sonucu(10^{-5})	Sayım Sonucu(10^{-6})
5	0	0
15	45	5
25	68	6
35	101	7
45	36	3
55	0	0
65	0	0

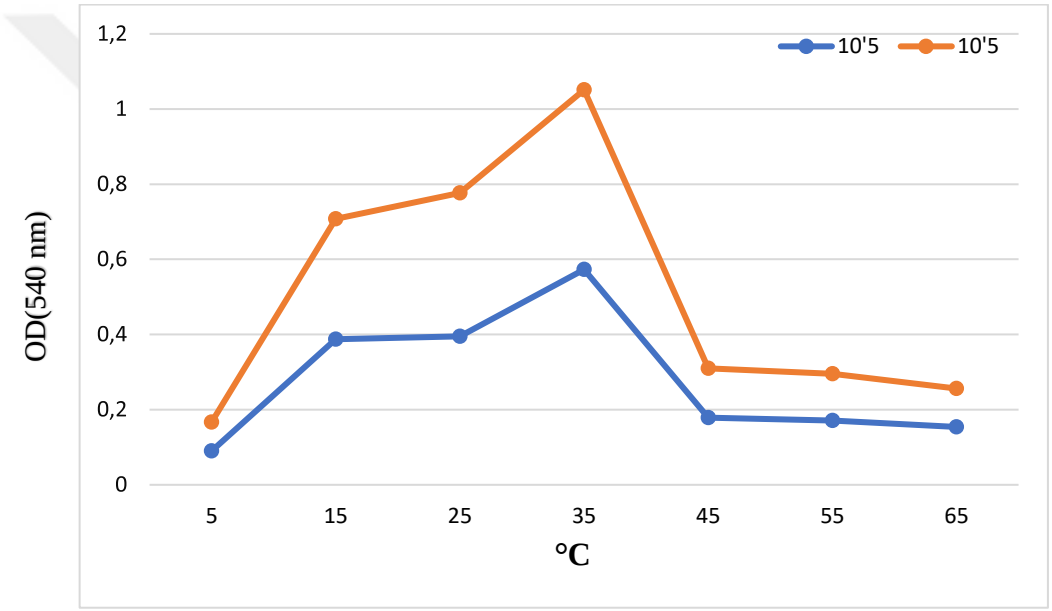


Şekil 19. *E. acetylicum*'un farklı sıcaklıklarda (°C) sayım sonuçları

NB besiyerinde sayımı yapılan örneklerin ekstrem sıcaklık ölçüm sonuçları tablo ve grafik kullanılarak ifade edilmiştir.

Tablo 5. *E. acetylicum*'un farklı sıcaklıklarda ölçülen OD (540 nm) değerleri

Sıcaklık(°C)	Ölçüm(10^{-5})	Ölçüm(10^{-5})
5	0,071	0,060
15	0,304	0,252
25	0,310	0,300
35	0,450	0,375
45	0,141	0,102
55	0,136	0,098
65	0,121	0,080



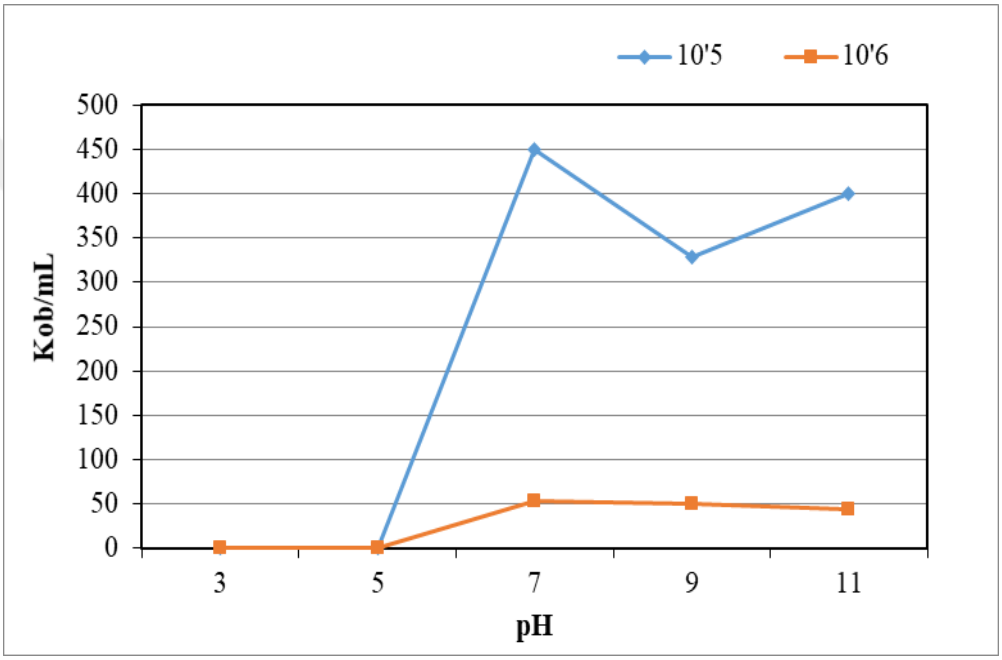
Şekil 20. *E. acetylicum*'un farklı sıcaklıklarda ölçülen OD (540 nm) değerleri

Ölçümler sonucunda elde edilen bulgular mikroorganizmanın gelişim gösterdiği optimum sıcaklık değerinin 35°C olduğunu ifade etmektedir. Buna ilaveten mikroorganizma ekstrem olarak 45°C sıcaklıkta gelişim göstermiş ve artan sıcaklık değerlerinde gelişiminin giderek azaldığı tespit edilmiştir.

E. acetylicum'un ekstrem pH koşullarının belirlenmesinde farklı pH değerlerinde (pH; 3,5 7, 9, 11) hazırlanmış NA ve NB sıvı besiyerine bakteri inokülasyonu sağlanmış ve sonrasında NB içeren tüpler 35 ºC de 200 rpm'de 48 saat, NA besiyerleri ise 35 ºC de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. NA besiyerinde sayımı yapılan örneklerin ekstrem pH sayım sonuçları tablo ve grafik kullanılarak ifade edilmiştir.

Tablo 6. *E. acetylicum*'unfarklı pH'larda sayım sonuçları

pH	Sayım Sonucu (10^{-5})	Sayım Sonucu (10^{-6})
3	0	0
5	0	0
7	450	53
9	328	50
11	400	44

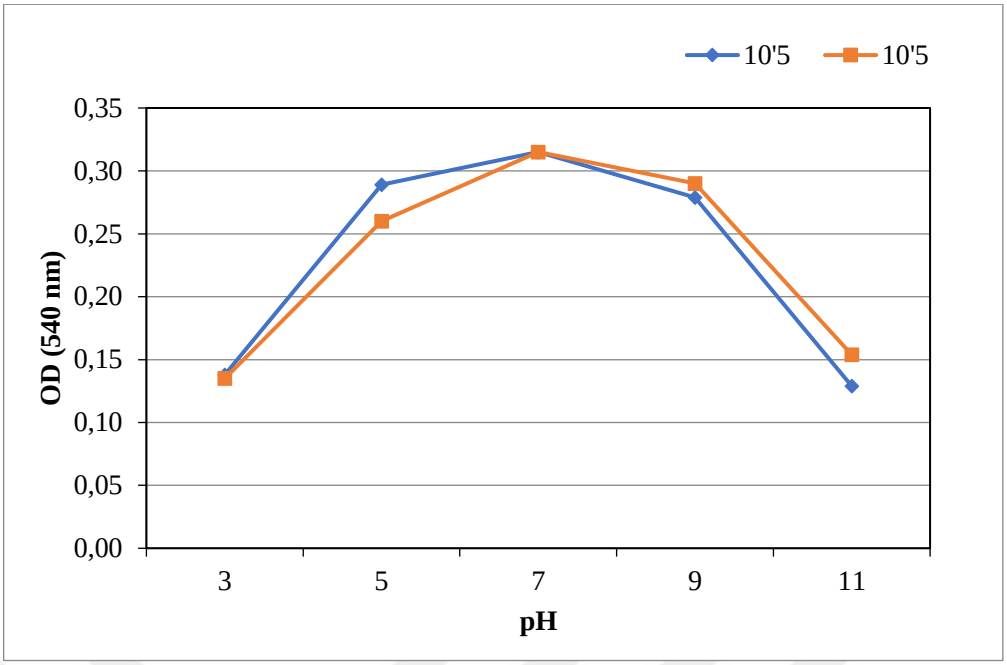


Şekil 21. *E. acetylicum*'un farklı pH'larda sayım sonuçları

NB besiyerinde sayımı yapılan örneklerin ekstrem pH ölçüm sonuçları tablo ve grafik kullanılarak ifade edilmiştir.

Tablo 7. *E. acetylicum*'un farklı pH'larda ölçülen OD (540 nm) değerleri

pH	Ölçüm Sonucu(10^{-5})	Ölçüm Sonucu(10^{-5})
3	0,138	0,135
5	0,289	0,261
7	0,315	0,315
9	0,279	0,294
11	0,129	0,154



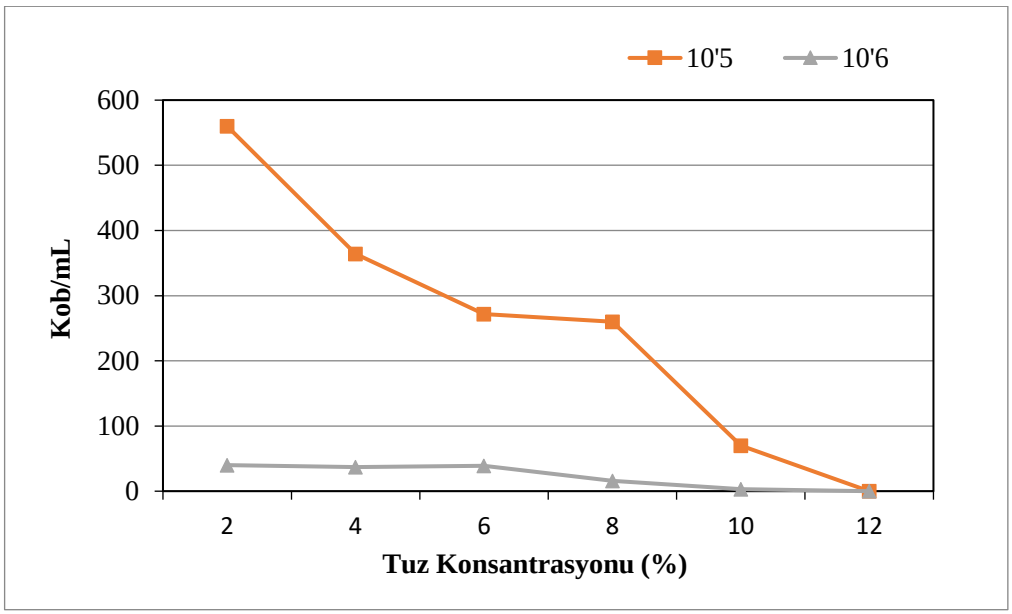
Şekil 22. *E. acetylicum*'un farklı pH'larda ölçülen OD (540 nm) değerleri

Ölçümler sonucunda elde edilen bulgular mikroorganizmanın gelişim gösterdiği optimum pH değerinin 7.00 olduğunu ifade etmektedir. Buna ilaveten mikroorganizma ekstrem olarak pH 11.00 değerlerine kadar gelişim göstermektedir. Asidik pH değerlerinde mikroorganizmanın gelişimi neredeyse mümkün değildir.

E. acetylicum'un ekstrem tuz konsantrasyonunun belirlenmesinde farklı tuz konsantrasyonlarına sahip (%2, %4, %6, %8, %10, %12) NA ve NB sıvı besiyerine bakteri inokülasyonu yapılmış ve sonrasında NB içeren tüpler 35°C de 200 rpm'de 48 saat, NA besiyerleri ise 35°C de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. NA besiyerinde sayımı yapılan örneklerin ekstrem tuz konsantrasyonu sayım sonuçları tablo ve grafik kullanılarak ifade edilmiştir.

Tablo 8. *E. acetylicum*'un farklı tuz konsantrasyonlarında (%) sayım sonuçları

Tuz Konsantrasyonu (%)	Ölçüm Sonucu (10^{-5})	Ölçüm Sonucu (10^{-6})
%2	560	40
%4	364	37
%6	272	39
%8	320	16
%10	70	3
%12	0	0

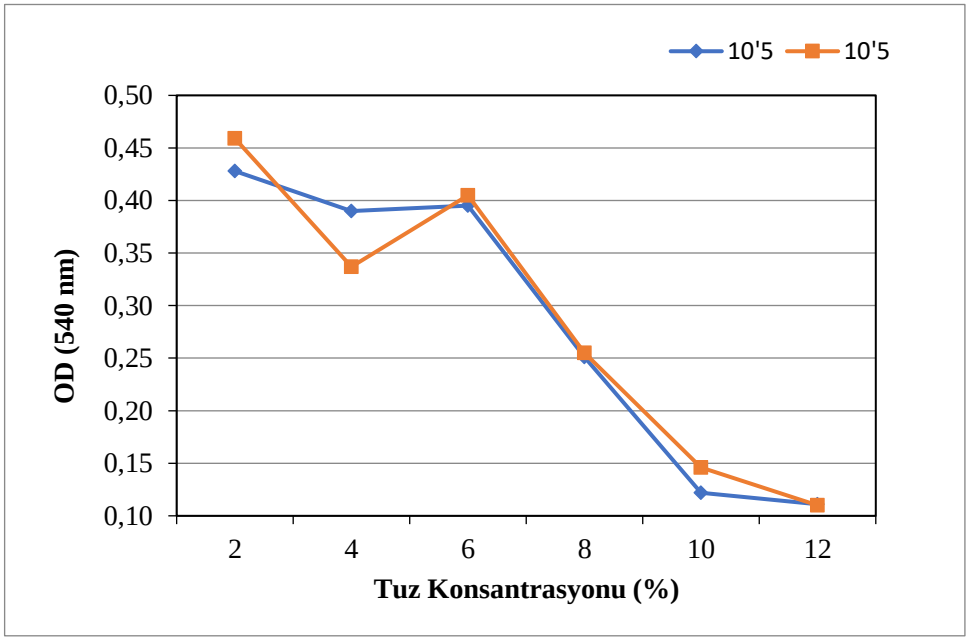


Şekil 23. *E. acetylicum*'un farklı tuz konsantrasyonlarında (%) sayım sonuçları

NB besiyerinde sayımı yapılan örneklerin ekstrem tuz konsantrasyonu ölçüm sonuçları tablo ve grafik kullanılarak ifade edilmiştir.

Tablo 9. *E. acetylicum*'un farklı tuz konsantrasyonlarında ölçülen OD (540 nm) değerleri

Tuz Konsantrasyonu (%)	Ölçüm Sonucu (10^{-5})	Ölçüm Sonucu (10^{-5})
%2	0,428	0,459
%4	0,390	0,337
%6	0,395	0,415
%8	0,251	0,255
%10	0,122	0,146
%12	0,146	0,146



Şekil 24. *E. acetylicum*'un farklı tuz konsantrasyonlarında ölçülen OD (540 nm) değerleri

Ölçümler sonucunda elde edilen bulgular mikroorganizmanın gelişim gösterdiği optimum tuz konsantrasyonunun %2 oranında olduğunu ifade etmektedir. Buna ilaveten mikroorganizma ekstrem olarak %10 tuz konsantrasyonuna kadar gelişim göstermektedir. %12 tuz konsantrasyonunda mikroorganizmanın gelişmediği tespit edilmiştir.

Çalışmanın bu aşamasında *E. acetylicum*'un gelişim gösterdiği ekstrem sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Ölçümler sonucunda *E. acetylicum*'un 45°C sıcaklık, pH 11,00 ve %10 tuz konsantrasyonu gibi ekstrem değerlerde gelişim gösterebilen bazik özellikli, yüksek tuz ve sıcaklık değerlerinde gelişebilien bir mikroorganizma olduğu tespit edilmiştir.

E. acetylicum'dan Kitinaz Enziminin Saflaştırılması ve Enzim Aktivitesinin Tespit Edilmesi

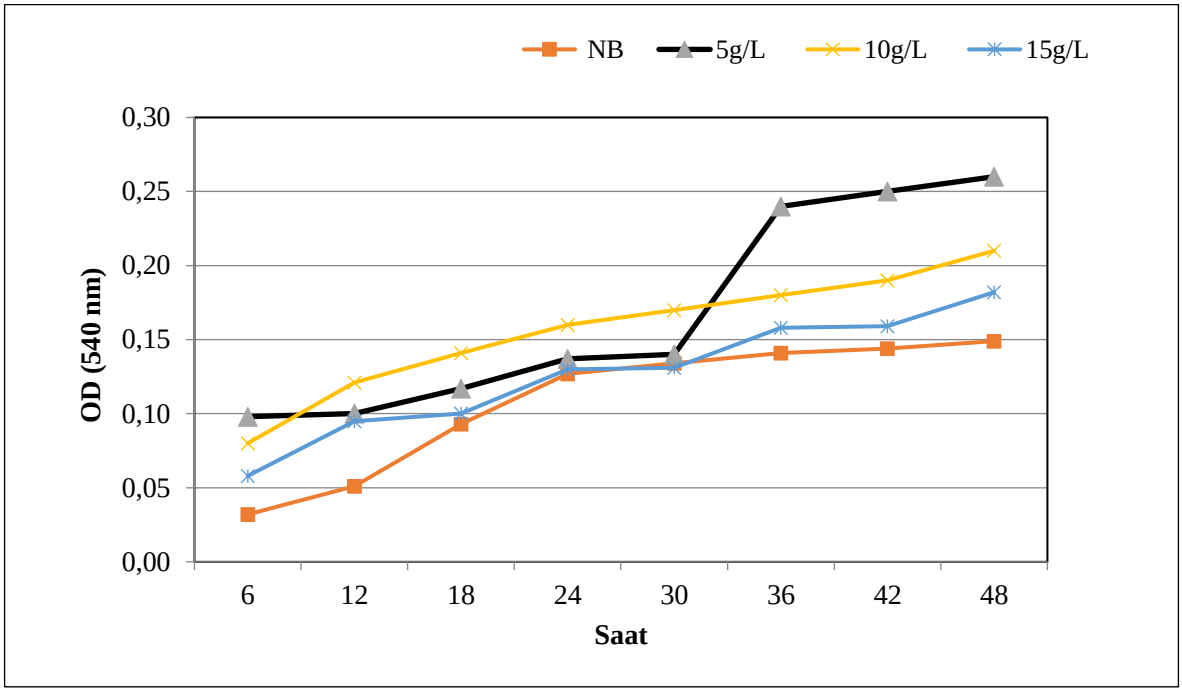
Çalışmanın bu aşamasında kitinaz enzim aktivitesinin tespit edilmesinden önce kitinaz enziminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bakterilerin farklı miktarlarda (0-5-10-15 g/L olacak şekilde) kollodial kitin katılmış besiyerlerine inokülasyonu sağlanmış, 2 gün boyunca 35 °C'de, 200 rpm'de inkübe edilmiştir. 6 saatte bir alınan örneklerin bakteri ölçümü yapılmış ve *E. acetylicum*'un gelişme kurvesi oluşturulmuştur. *E. acetylicum*'un gelişme eğrisi oluşturulup mikroorganizmanın optimum gelişim zamanını tespit edilmesi hedeflenmektedir. Optimum gelişim zamanı tespit edilmesinin nedeni ise kitinaz aktivitesi ölçümünde optimum zamana göre işlem yapılmasının amaçlanması olarak belirtilmiştir.

Optimum gelişim süresinin belirlenmesinin ardından bakteri amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırılarak enzim aktivitesinin en yüksek olduğu aralık kitinazın amonyum sülfat doygunluk aralığı olarak kabul edilmiş ve enzim aktivitesinin ölçülmesinde bu aralıktan yararlanılması amaçlanmıştır.

Belirlenen doygunluk aralığı enzim çözeltisi olarak kabul edilerek hem aktivite ölçümünde hemde enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Enzim aktivitesinin ölçülmesiyle kitinazın optimum düzeyde aktivite gösterdiği besiyeri bileşimi ve kullanılması gereken substratın bileşiminin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmada son olarak fitaz enzim aktivitesinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda *Exiguobacterium acetylicum* Nutrient Broth sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve optimizasyon sonucundan belirlenmiş değerler olan 35°C'de 48 saat süre ile steril etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ölçümden önceki ara basamakların ardından 700nm'ye ayarlı spektrofotometre cihazında köre karşı ölçüm yapılarak sonuçlar grafikte gösterilmiştir.

E. acetylicum NA da 35°C'de 48 saat geliştirilmiştir. Ardından gelişen kültürden bir öze dolusu alınmış ve farklı miktarlarda kollodial kitin içeren (0-5-10-15 g/L) NB besiyerlerine inokülasyonu sağlanmıştır. İnokülasyonun ardından örnekler 35 °C'de, 200rpm'de 2 gün boyunca inkübasyona bırakılmış ve her 6 saatte bir alınan örnekler % 0,85'lik FTS çözeltisi ile on kat seyreltilmiş ve spektrofotometrede ($_{OD540}$) köre karşı (NB) ölçülmüş ve sonuçlar grafikle belirtilmiştir (Şekil 26).



Şekil 25. *E. acetylicum*'un kitinli besiyerinde 48 saatlik gelişme grafiği

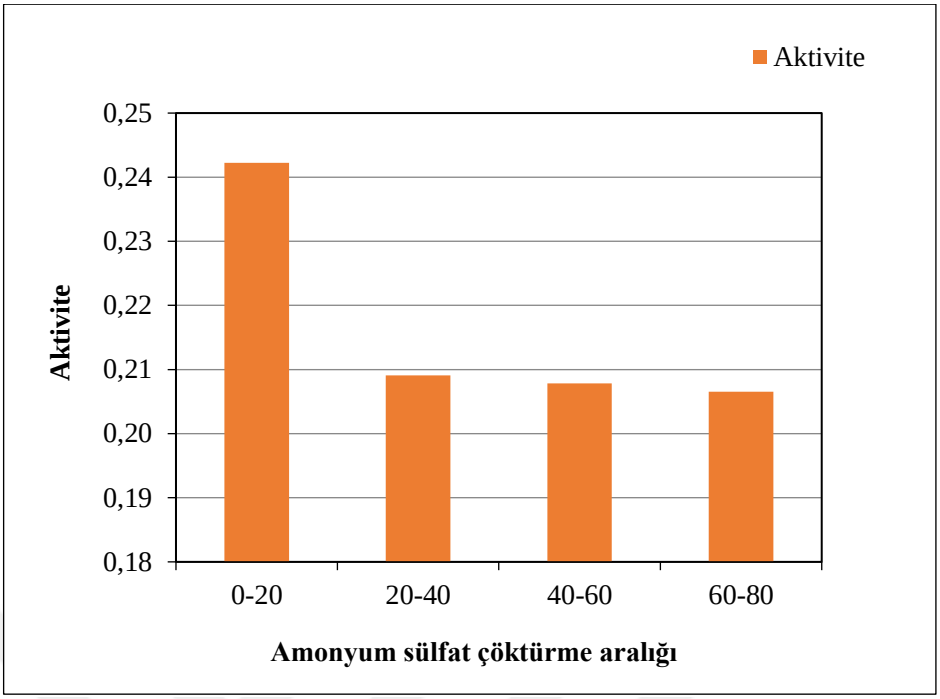
E. acetylicum'un optimum gelişim zamanı 48 saat olarak tespit edilmiştir.

E. acetylicum 48 saatte 5g/L kitinli besiyerinde optimum gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Bu işlemin ardından kitinaz aktivitesini hesaplayabilmek amacıyla kısmi saflaştırma yapılmıştır. Enzim saflaştırması amonyum sülfat çöktürmesi ile yapılmış olup bu işlem sonucu enzimin en iyi aktivite gösterdiği amonyum sülfat doygunluk aralığı 0-20 olarak belirlenmiştir.

Aktivite ölçümlerinde elde edilen absorbans değerleri hesaplanmış olan katsayı ile çarpılarak aktivitenin değeri U/mL cinsinden verilmiştir.

Tablo 10. Amonyum sülfat doygunluk aralıkları

Amonyum Sülfat Doygunluk Aralığı	Ölçüm Sonucu (OD 540 nm)
0-20	0,190
20-40	0,164
40-60	0,163
60-80	0,162

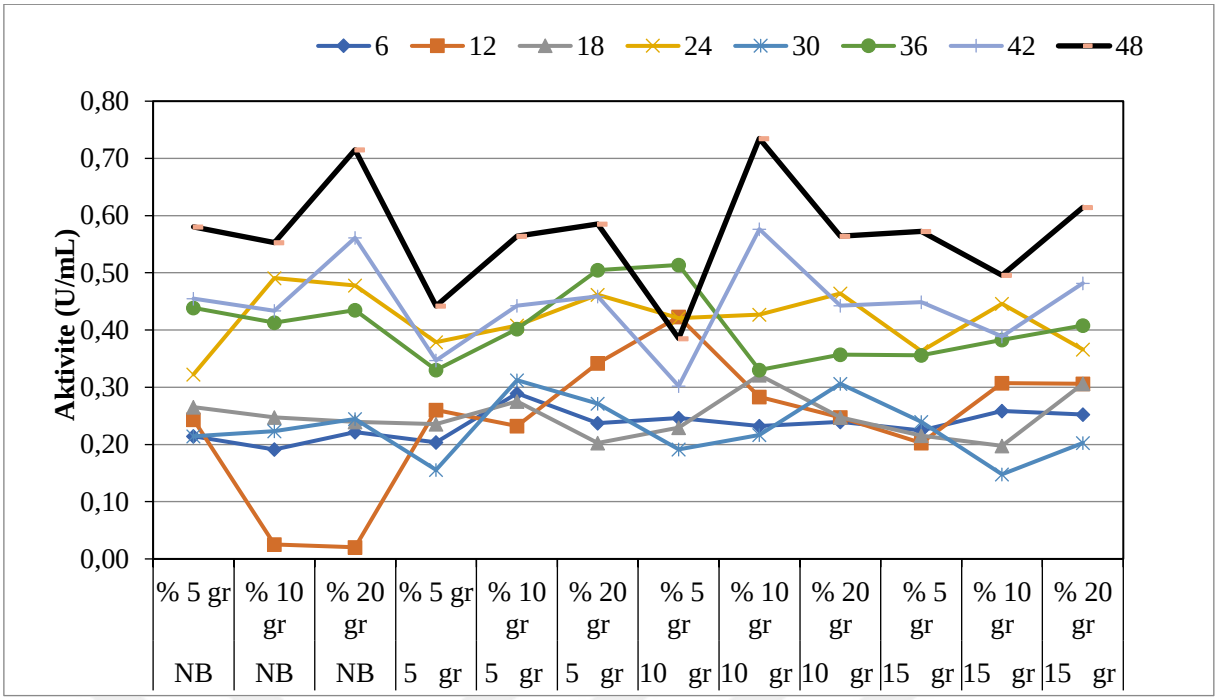


Şekil 26. Amonyum sülfat doygunluk aralıkları

Kitinaz aktivitesi ölçümü için tespit edilen en iyi doygunluk aralığı ölçüm öncesi basamaklarda belirlenen enzim çözeltisi kullanılmıştır. Aktivite ölçümünde elde edilen absorbans değerleri hesaplanmış olan katsayı ile çarpılarak aktivitenin değeri U/mL cinsinden tablo ve grafikte verilmiştir.

Tablo 11. Kitinaz enzim aktivitesi ölçüm sonuçları

Besiyeri Bileşimi	Substrat Bileşimi (%Kolloidal Kitin)	6 saat	12 saat	18 saat	24 saat	30 saat	36 saat	42 saat	48 saat
NB	% 5 g	0,21	0,24	0,27	0,32	0,21	0,44	0,46	0,58
NB	% 10 g	0,19	0,03	0,25	0,49	0,22	0,41	0,43	0,55
NB	% 20 g	0,22	0,02	0,24	0,48	0,24	0,43	0,56	0,72
5 g/L	% 5 g	0,20	0,26	0,24	0,38	0,16	0,33	0,35	0,44
5 g/L	% 10 g	0,29	0,23	0,28	0,41	0,31	0,40	0,44	0,56
5 g/L	% 20 g	0,24	0,34	0,20	0,46	0,27	0,50	0,46	0,59
10 g/L	% 5 g	0,25	0,42	0,23	0,42	0,19	0,51	0,30	0,39
10 g/L	% 10 g	0,23	0,28	0,32	0,43	0,22	0,33	0,58	0,73
10 g/L	% 20 g	0,24	0,25	0,25	0,46	0,31	0,36	0,44	0,56
15 g/L	% 5 g	0,22	0,20	0,22	0,36	0,24	0,36	0,45	0,57
15 g/L	% 10 g	0,26	0,31	0,20	0,45	0,15	0,38	0,39	0,50
15 g/L	% 20 g	0,25	0,31	0,31	0,37	0,20	0,41	0,48	0,61



Şekil 27. Kitinaz enzim aktivitesi ölçüm sonuçları

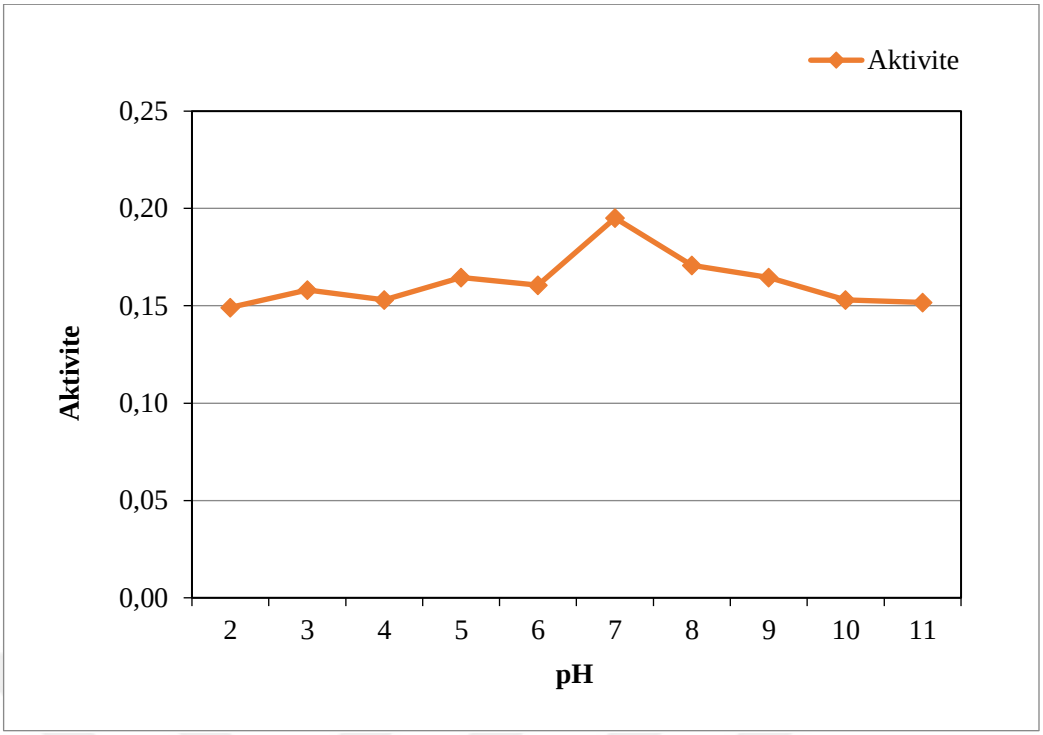
Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 5 g/L kolloidal kitin içeren NB besiyerinde geliştirilen ve içerisinde %10 g/L oranında substrat bulunan ortamda bakteri en yüksek kitinaz enzimi piki vermiştir. Enzim aktivitesinin ölçümü ardından enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

Optimum pH aktivitesi tayininde en yüksek amonyum sülfat doygunluk aralığı belirlenen örnekten devam edilmiştir. Enzim aktivitesi ölçümü sonucu belirlenen konsantrasyonda kollodial kitin içeren substrat çözeltileri farklı pH değerlerine sahip (pH 2,0-11,0) tamponlar kullanılarak hazırlanmış ve optimum pH değerleri aşağıdaki tablo ve grafikte ifade edilmiştir.

Aktivite ölçümünde elde edilen absorbans değerleri hesaplanmış olan katsayı ile çarpılarak aktivitenin değeri U/mL cinsinden verilmiştir.

Tablo 12. Kitinazın optimum pH ölçüm sonuçları

pH Değeri	Ölçüm Sonucu ($_{OD540}$)
pH 2	0,117
pH 3	0,124
pH 4	0,126
pH 5	0,129
pH 6	0,130
pH 7	0,153
pH 8	0,134
pH 9	0,129
pH 10	0,120
pH 11	0,119



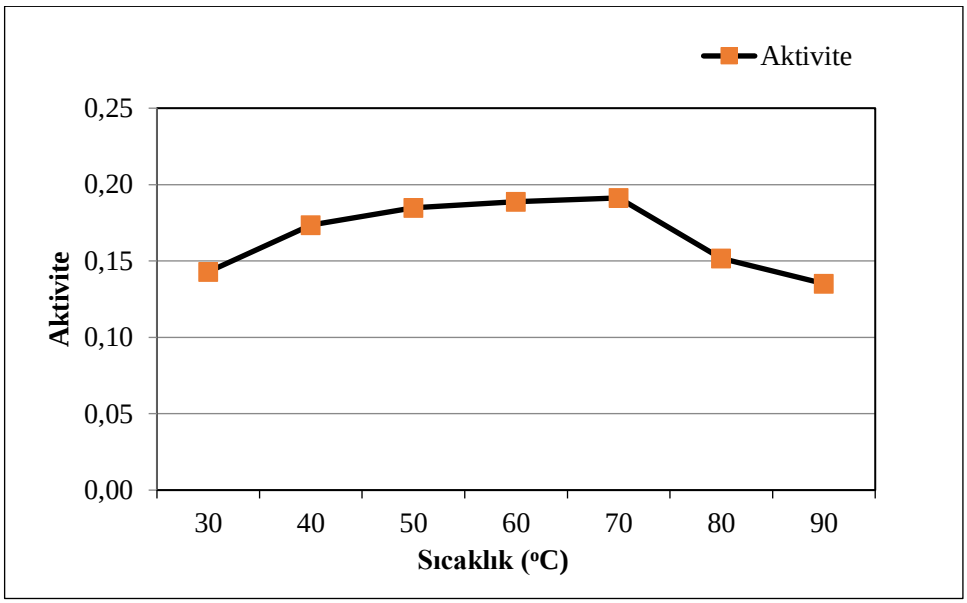
Şekil 28. Kitinazın optimum pH ölçüm sonuçları

Elde edilen sonuçlara göre kitinazın pH 2.00-11.00 aralığında aktivite gösterdiği ve optimum aktivite aralığının pH 7,00 olduğu tespit edilmiştir.

Kitinazın optimum sıcaklık değerini belirleyebilmek amacıyla en yüksek amonyum sülfat doygunluk aralığı belirlenen örnekten devam edilmiştir. Bu doğrultusunda analiz için farklı sıcaklık değerleri(30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C) seçilmiştir. Elde edilen optimum sıcaklık değeri aşağıdaki tablo ve grafikte ifade edilmiştir.

Tablo 13. Kitinazın optimum sıcaklık ölçüm sonuçları

Sıcaklık	**Ölçüm Sonucu ($_{OD540}$)**
30°C	0,112
40°C	0,136
50°C	0,145
60°C	0,148
70°C	0,150
80°C	0,119
90°C	0,106



Şekil 29. Kitinazın optimum sıcaklık ölçüm sonuçları

Elde edilen sonuçlara göre kitinaz enziminin 30- 90°C aralıklarından aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri ise 70°C olarak tespit edilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında fitaz enziminin aktivitesi belirlenmiştir. Bu amaçla, optimizasyon sonucu elde edilen süre ve sıcaklık değerlerinde geliştirilmiş *E. acetylicum* santifrüj işlemine tabii tutulmuştur. Süpernatant ve çökelti birbirinden ayrıldıktan sonra süpernatanttan devam edilmiştir. İlgili substrat ve renklendirme çözeltileri ile muamele gören enzim çözeltisi 700 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede köre karşı ölçülmüş ve 0.273 absorbans göstermiştir. Optimum süre ve sıcaklık değerlerinde gelişimi sağlanan *E. acetylicum*'un fitaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.

E. acetylicum (16s rRNA dizilim GenBank erişim numarası KY418166)'un karakterizasyonu: Hücreler basil şeklinde, gram (+), NA ortamında fakültatif anaerob olarak 35ºC, 48 saat inkübasyondan sonra orta yuvarlak dışbükey ve sarı renkli koloniler oluşturmaktadır. Ekstrem gelişme koşulları 5-65 ºC'de (optimum 35 ºC), pH 5.0-11.0 (optimum pH 7.0) NaCl %2-10 (optimum %2) olarak belirlenmiştir. Oksidaz, katalaz, nişasta hidrolizasyon testi pozitif ancak kazein, indol ve nitrat redüksiyonu negatif olarak tespit edilmiştir. Şeker tolerans testi sonucunda bakteri optimum % 0.5 oranında olmakla beraber %15 ve %60 ekstrem koşullarda da gelişme göstermiştir.

E. acetylicum'dan elde edilen kitinaz enziminin % 5 g/L (optimum) kolloidal kitin varlığında 70 ºC sıcaklıkta pH'nın 7,00 olduğu bir ortamda maksimum aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *E. acetylicum*'un fitaz enzim aktivitesi 700 nm dalga boyunda ölçülmüş ve 0.273 absorbans göstermesi ile fitaz enzimini üretme yeteneğine sahip olduğu sonucuna varılmıştır

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılmış olan bu tez çalışmasında atık sulardan izole edilen *E. acetylicum*'un biyokimyasal özelliklerinin belirlenerek karakterizasyonunun yapılması ve gelişim gösterdiği ekstrem koşulların tespit edilebilmesi amaçlanmıştır. Buna ilaveten fitaz ve kitinaz üretme kabiliyetini ve *E. acetylicum*'dan kısmi olarak saflaştırılan kitinaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir.

Biyokimyasal testleri tamamlanan *E. acetylicum*'un gram (+), katalaz (+), oksidaz (+), nişasta hidrolizasyon yeteneğine sahip, sütteki kazeini hidrolize edemeyen, indol(-), nitrat redüksiyon yeteneğine sahip olmayan ve yüksek şeker konsantrasyonlarına toleranslı bir bakteri türü olduğu belirlenmiş ve bu bilgilere göre karakterize edilmiştir. Collins *et al.* (1984), yapmış oldukları çalışmada *Exiguobacterium* cinsinin yuvarlak yapıda gelişim gösterip gram pozitif özellikte olduklarını bildirmeleri, elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında gram özelliklerinin doğru saptanması ve inkübasyon sonucu gözlenen kültürlerin sarımsı-yuvarlak yapıda olmaları açısından paralellik göstermektedir.

Biyokimyasal karakterizasyonun ardından *E. acetylicum*'un gelişim gösterdiği ekstrem koşullar belirlenmiştir. *E. acetylicum* ekstrem olarak orta derecelerdeki sıcaklıklarda, yoğun bazik ve yoğun tuzlu besi ortamında gelişim gösterebilen direnci yüksek bir bakteri olduğu tespit edilmiştir. Mikroorganizmanın optimum olarak ise ekstrem sıcaklığından daha düşük bir değerde, nötr pH ve az miktarda tuz konsantrasyonuna sahip besi ortamında gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Meng *et al.* (2020), yaptıkları çalışma optimum ortam koşullarının belirlenmesi yönünden çalışmamızı destekler niteliktedir.

Yapılan aktivite testleri sonucunda *E. acetylicum*'un kitinaz ve fitaz enzim aktivitesine sahip olduğu tanımlanmıştır. Bu aktivite değerlerinin düşük değerlerde seyretmemesi mikroorganizmanın üretim kapasitesinin yüksek olduğunu kanıtlar nitelikte sonuçlar vermiştir. Kumar *et al.* (2017), ve Kumar *et al.* (2014), yaptıkları çalışmada *Exiguobacterium sp.*'nin fitaz ve kitinaz enzimi üretme yeteneğine sahip olduklarını belirlemişlerdir. Bu çalışmalar elde ettiğimiz sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Kitinaz enzimi için yapılan optimum sıcaklık ve optimum pH değerlerinin belirlenmesine yönelik testler, Şenol (2014),ün *P. fluorescens* ve *B. subtilis* bakterilerinin *F. culmorum*'a karşı antifungal etkinliğini belirlediği ve bakterilerden ettiği kitinaz enziminin kısmi saflaştırılarak optimum sıcaklık ve pH değerlerini tespit ettiği çalışmasıyla benzerlik göstermektedir. Alınan sonuçlar noktasında ise küçük farklar olmasına karşı genel olarak paralellik gösteren değerler elde edilmiştir.

Exiguobacterium acetylicum'un ekstrem koşullarda gelişim göstermesi, kitinaz ve fitaz aktivitesine sahip olması, sahip olduğu kitinazın optimum şartlarının belirlenebilmesi çalışmanın başında verilen amaca uygun ilerlendiğini ve tezin amacına uygun şekilde tamamlandığını göz önüne sermektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda, yapılacak sonraki araştırmalara yönelik öneriler şu şekilde sıralanmıştır:

1) *E. acetylicum*'un yüksek miktarda şeker ihtiva eden besi ortamlarında gelişim gösterebilen, şeker toleransı yüksek bir bakteri olduğu,
2) *E. acetylicum*'un asidik ortamlarda gelişim gösteremeyen fakat bazik ortamlarda gelişimini sürdürebilen bir bakteri olduğu,
3) *E. acetylicum'*un fitaz ve kitinaz enzimlerini üretebildiği,
4) *E. acetylicum*'dan üretilen kitinaz enziminin nötr pH derecelerinde ve oldukça yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterebilen bir enzim olduğu belirlenmiştir ve bu sonuçlar doğrultusunda;
5) Bu bakteri ve bakteriden elde edilen sekonder metabolitlerin çeşitli endüstriyel alanlarda(gıda, tarım tekstil, atık giderimi vb.) kullanılabileceği ve bakterinin diğer enzimatik özelliklerinin sonraki çalışmalarda belirlenmesi önerilmektedir.

KAYNAKÇA

Akçakoca, D., 2014. Topraktan İzole Edilen Bacıllus Sp. Suşlarından Fitaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Akkaya, A. and Pazarlıoğlu. N., 2012. 21.Yüzyılın Anahtar Teknolojisi: Beyaz Biyoteknoloji. Ege Üniversitesi, https://www.hidropolitikakademi.org/uploads/wp/2017/01/21.y%C3%BCzy%C4%B1l%C4%B1n-teknolojisi-beyaz-biyoteknoloji-.pdf (21.07.2020).

Albayrak, Ş. 2018. Türkiyenin Farklı Bölgelerinde Bulunan Kaplıcalardan Alınan Örneklerden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Konvensiyonel ve Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu, Endüstriyel Açıdan Önemli Olan Enzimleri Üretme Potansiyeline Sahip Suşların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Aliabadi, M.A., Ghasemi, M.F., Isaazadeh, K.H., 2014. Antimicrobial activity bioactive compounds produced by Exiguobacterium acetylicum PTCC1756 against pathogenic bacteria. Scientific Journal of Microbiology, 3(4) ,55-62.

Anonim, 2020 c. https://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf (Erişim: 26.07.2020).

Anonim,2020a. https://news.stanford.edu/pr/2015/pr-worms-digest-plastics-092915.html (Erişim: 20.07.2020)

Anonim,2020b.https://tr.wikipedia.org/wiki/Biyoteknoloji#:~:text=Biyoteknoloji%3B%20h%C3%BCcre%20ve%20doku%20biyolojisi,DNA%20teknolojisiyle%20bitki%2C%20hayvan%20ve (Erişim: 20.07.2020)

Anuradha, V., Revathi, K. 2013. Purification and Characterization of Bacterial Chitinase isolated from Crustacean Shells. Int. J. Pure App. Bioscience, 1(4), 1-11.

Arda, M., 1997. Temel Mikrobiyoloii (1. Basım). Ankara: Medisan yayınevi.

Arslan, S., 2017. Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Asan, M., 2007. Microbial Phytases, Applications And Biotechnology. Tarım Bılımleri Dergısı-Journal Of Agrıcultural Sciences, 13(2), 147-155.

Aziz, G., Nawaz, M., Anjum, A. A., Yaqub, T., Nazir, J., Khan, S. U., and Aziz, K., 2015. Isolation and characterization of phytase producing bacterial isolates from soil. JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences, 25(3),

Baltacı, Ö., 2015. Erzurum Mezbahalarından Toplanan İşkembe Örneklerinden Selülolitik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Barış, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlataşı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi. . Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Batur, A., 2012. Biyoteknoloji, Kırklareli Üniversitesi, http://www.kirklareli.edu.tr/download//byfiles/50353588.html (20.07.2020).

Baygın, E., 2015. Topraktan Fitaz Enzimi Üreten Bacıllus Sp. Suşlarının Taranması Ve Besinsel Faktörlerin Fitaz Üretimi Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa

Beilen, J.B. and Li, Z., 2002. Enzyme technology: an overview. Current Opinion in Biotechnology, 13, 338–344.

Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118960608.gbm00579 (20.07.2020)

Bhattacharya, S., Das, A., Samadder, S., and Rajan, S.S., 2017. Biosynthesis and characterization of a thermostable, alkali-tolerant chitinase from *Bacillus pumilus* JUBCH08 displaying antagonism against phytopathogenic Fusariumoxysporum. 3 Biotechnology, 6(1), 87.

Brzezinska, M. S., Jankiewicz. U., Burkowska, A. and Walczak, M., 2014. Chitinolytic Microorganisms and Their Possible Application in Environmental Protection. Curr Microbiol, 68, 71–81.

Chang, W-T., Chen, M-L. and Wang, S-L., 2010. An antifungal chitinase produced by Bacillus subtilis using chitin waste as a carbon source. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26, 945–950.

Choi, Y.M., Suh, H.J., Kim, J.M., 2001. Purification and properties of extracellular phytase from Bacillus sp. KHU-10. Journal of Protein Chemistry, 20, 287-292.

Collins, M.D., Lund, B.M., Farrow, J.A.E. and Schleifer, K.H., 2009. Exiguobacterium.

Çalışkan Özdemir, S., 2018. Çeşitli Kaynaklardan Fitaz Üreticisi Fungusların İzolasyonu Ve Termostabil Fitaz Üretimi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Çetiner, S., 2005. Türkiye Ve Dünyada Tarımsal Biyoteknoloji Ve Gıda Güvencesi: Sorunlar

Dinç, Y., 2009. Üreaz Enziminin Bazı Tıbbi Bitkiler Tarafından İnhibisyonu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Dokuzparmak, E., Sirin, Y., Cakmak, U., and Ertunga, N. S., 2016. Purification and characterization of a novel thermostable phytase from the thermophilic *Geobacillus sp.* TF16. International Journal of Food Properties, 1-13.

Dolapçı, İ., 2016. Bakterilerde İzolasyon, Tanı Ve İdentifikasyon Yöntemleri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi,https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12575/41250/Bakterilerde%20izolasyon%2C%20tan%C4%B1%20ve%20identifikasyon.pdf?sequence=1&isAllowed=y (01.08.2020).

Erkek, R., Ünlü, H.B., 2003. Fitaz Enziminin Etlik Piliçlerin Beslenmesinde Kullanımı. Hayvansal Üretim, 44(2), 10-19.

Erken, S.G., 2013. Fitaz Üreten Fungustan Enzimin Üretimi, Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisan, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Fidancı, U.R., 2010. Enzimler.Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Enzimler.html(22.07.2020).

Gee, J.M., Lund, B.M., Metcalf, G., Peel, J., 1980. Properties of a new group of alkalophilic bacteria. Journal Gen. Microbiology,117, 9-18.

Greiner, R. and Konietzny, U., 2006. Phytase for food application. Food Technology and Biotechnology, 44(2), 125–140.

Hacıabdullahoğlu, N.S., 2018. Lor Peynirinden Elde Edilen Lactobacillus Coryniformis'in Kitinazaktivitesinin Belirlenmesi ve Alternaria Alternata Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Huang, J.H., Chen, C.J., Su, Y.C., 1996. Production of chitinolytic enzymes from a novel species of Aeromonas. Journal of Industrial Microbiology, 17(2), 89-95.

Işık, Y., 2017. Marul'dan İzole Edilen Mikroorganizmaların Biyokimyasal Ve Moleküler Yöntemlerle Tanılanması, Fitaz Ve Kitinaz Aktivitelerinin Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Kasana, R.C., and Pandey, C.B., 2018. Exiguobacterium: an overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture. Critical Reviews in Biotechnology, 38(1), 141-156.

Kılıç, S.M., 2017. Pectobacterium Carotovorum'un İzolasyonu, 16s Rrna İle Tanılanması, Bakterinin Fitaz Enzim Aktivitesi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Kılınç, E., 2018. Termofilik Exiguobacterium profundum'un Uranyum(VI)'a Karşı Direnci ve Uranyum(VI) Biyoakümülasyonunun UV-vis Spektrofotometrik Tayini. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi/ Journal of the Institute of Natural & Applied Sciences, 23(1), 87 – 95.

Kırıcı, M., Demir, Y., Beydemir, Ş., Atamanalp, M., 2016. The effect of al Al^{3+} ans Hg^{2+} on glucose 6-phosphate dehydrogenase from capoeta umbla kidney. Applied Ecology and Environmental Research, 14(2), 253-264.

Konietzyn, U. and Greiner, R., 2004. Bacterial phytase: Potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. Brazilian Journal of Microbiology, 35, 1118.

Kumar, A., and Suresh, P.V., 2014. Biodegradation of Shrimp Biowaste by Marine Exiguobacterium sp. CFR26M and Concomitant Production of Extracellular Protease and Antioxidant Materials: Production and Process Optimization by Response Surface Methodology. Marine Biotechnology, 2014(16), 202-218.

Kumar, A., Singh, V., Kumar, R., 2006. Characterization of an alkaliphile, Exiguobacterium sp. and it's application in bioremediation. International conference on extremophiles, France.

Kuzu, S.B., 2008. Kitinaz Üreten Bacillus İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Küfrevioğlu, Ö.İ., Keha, E.E., 2008. Enzimler. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Ankara, 91-139.

Lei, X.G., Porres, J.M., Mullaney, E.J., Brinch-Pedersen, H., 2007. Phytase: source, structure and application. In: Industrial Enzymes (Section E) (Polaina, J. And MacCabe, A. P.), The Netherlands, Springer, 505–529.

Lisa, G., Ong, A., Lam, H.K., Lim, M.Y., Tan,T.X., 2017. Process Optimization on Chitinase Production by Locally Isolated Enterobacter sp. and Zymomonas sp. International Journal of Chemical Engineering and Applications, 8(4),

Matyushenko, I. Sviatukha, I. and Grigorova-Berenda, L., 2016. Modern Approaches To Classification Of Biotechnology As A Part Of NBIC-Technologies For Bioeconomy. British Journal of Economics, Management & Trade, 14(4), 3-6.

Meng, X. Chang, Y. Q., Zhou, L.Y., Du, Z.J., 2020. Exiguobacterium flavidum sp. nov., isolated from the Red Maple Lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020(70), 2359-2365.

Mukesh Kumar, D.J., 2011. Isolation, production & application of extracellular phytase by Serratia Marcescens. Asian Journal of Experimental Biological Sciences, 2(4), 663-666.

Oh, B.C., Choi, W.C., Park, S., Kim, Y.O., Oh, T.K., 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. Applied Microbiology and Biotechnology, 63(4),362-372

Olcay, H., 2015. Kitin Ve Kitosanın Tekstil Ve Biyomühendislikte Uygulamaları. İstanbul Ticaret Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 14(28), 63-84.

Radjacommare, R., Kandan, A., Nandakumar, R. and Samiyappan, R., 2004. Association of the Hydrolytic Enzyme Chitinase Against Rhizoctonia solani in Rhizobacteria-treated Rice Plants. Journal of Phytopathology, 152, 365-370.

Sandıkçıoğlu, G., 2016. Fitaz Enzimi Üretimi ve Etkinliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Sarı, B., 2016. Rize Ayder Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, Ksilanaz Enziminin Geobacillus galactosidasius BS61 Bakterisinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Sarıbuğa, E., Dikbas, N., Nadaroglu, H., Senol, M., 2014. Partial Purification, Characterization of Phytase Enzyme from *Lactobacillus acidophilus* Bacteria and Determination of It's Some Kinetic Properties. Journal of Pure and Applied Microbiology, 8, 91-96.

Saygılı, H., Sahin, F., Aysan Y., 2006. Fitobakteriyoloji. Meta Basım Matbaacılık, 203, Türkiye.

Selvakumar, G., Joshi, P., Nazim, S., Mishra, P., Kundu, S., Gupta, H.S. 2009. Exiguobacterium acetylicum strain 1P (MTCC 8707) a novel bacterial antagonist from the North Western Indian Himalayas, World J Microbiol Biotechnol, 25(1),131–137.

Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Prinz, H., Estibeiro, P., Duncan, R.R., Svasti, J. and Fothergill-Gilmore, L.A., 2004. An endochitinase A from Vibrio carchariae: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. Archives of Biochemistry and Biophysics, 424, 171-180.

Sümengen, M., 2011. Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanakları. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Şenol, M., 2014. P. Fluorescens ve B. Subtilis Bakterilerinin F. Culmorum'a Karşı Antifungal Etkinliği, Bakterilerden Elde Edilen Kitinaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması Ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Tarakçıoğlu, S., 2016. Erzurum Ilıca Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Bacillus Thermoamylovorans ST-10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karekterisazyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Temiz, A. 1994. Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri (1. Basım). Ankara: Şafak matbaacılık.

Tran, T.T., 2010. Thermostable phytase from a Bacillus sp. heterologous production, mutation, characterization and assay development. Doktora Tezi, Lund Üniversitesi Biyoteknoloji Departmanı, İsveç.

Üçgül, İ., Aras, S. and Özdemir Küçükçapraz, D., 2016. Farklı Hammadde Kaynaklarından Kitinin Saflaştırılması ve Tekstil Uygulamaları. Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9(1), 46-56.

Ünal, A., 2020. Endüstriyel Biyoteknoloji Uygulamaları Ve Biyoekonomi. Tarımsal Ve Endüstriyel Biyoteknoloji Uygulamaları – Biyoekonomi, Ed: Kaan Hürkan. İksad Yayınevi, Ankara, 123-124.

Vahed, M., Motalebi, E., Rigi, G., Akbari Noghabi, K., Soudi, M. R., Sadeghi, M., and Ahmadian, G., 2013. Improving the chitinolytic activity of Bacillus pumilus SG2 by random mutagenesis. Journal of Microbiol Biotechnology, 23(11), 1519-1528.

Ve Öneriler. Sabancı Üniversitesi, https://www.inovasyon.gen.tr/images/makaleler/ sizdenBize/S.Cetiner.Inovasyon.org.pdf (20.07.2020)

Vishnivetskaya, T.A., Kathariou, S., Tiedje, J.M., 2009. The Exiguobacterium genus: biodiversity and biogeography. Extremophiles, 2009(13), 541–555.

Wiwat, C., Siwayaprahm, P. and Bhumiratana, A., 1999. Purification and Characterization of Chitinase from Bacillus Circulans No.4.1. Current Microbiology, 39, 134-140

Wulandari, R., Sari, E. N., Ratriyanto, A., Weldekiros, H., & Greiner, R. (2015). Phytase-Producing Bacteria from Extreme Regions in Indonesia. Brazilian Archives of Biology and Technology, 58(5), 711-717.

Xin, H., Itoh, T., Zhou, P., Suzuki, K., Kamekura, M., Nakase, T., 2000. Natrinema versiforme sp. nov., an halophilic archaeon from Aibi salt lake, İnt. J. Syst. And Evolut. Microbiology, 50, 1297-1303.

Yarza, P., Richter. M., Peplies, J., Euzeby, J., Amann, R., Schleifer, K.H., Ludwig, W., Glockner, F.O., Rossello-Mora, R., 2008. The AllSpecies Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. Syst Appl Microbiology, 31, 241-250.

Yılmaz, G.,2019. Antifungal Ajan Adayı Olarak Bakteriyal Kitinaz Üretimi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.

Yuli, E.P., Suhartono, T., Rukayadi, Y., Hwang, J.K. and Pyun, R.Y., 2004. Characteristics of Thermostable Chitinase Enzymes from the Indonesan Bacillus sp. 13.26. Enzyme and Microbial Technology, 35, 147-153.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Emre CANCA
Doğum tarihi:	03.03.1996
Doğum Yeri:	Çayeli/RİZE
Uyruğu:	T.C
Adres:	
Tel:	05414975354
E-mail:	emre.canca96@gmail.com
Eğitim	
Lise:	Tevfik İleri Anadolu Lisesi/RİZE
Lisans:	Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği 2014-2018
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi/Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı/Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı 2020
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	(Okuma B1, Yazma B1, Anlama B1, Konuşma B1)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	