

***P. fluorescens* VE *B. subtilis* BAKTERİLERİNİN
F. culmorum'a KARŞI ANTİFUNGAL ETKİNLİĞİ,
BAKTERİLERDEN ELDE EDİLEN
KİTİNAZ ENZİMİNİN KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE
BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Merve ŞENOL

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ
2014
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

P. fluorescens VE *B. subtilis* BAKTERİLERİNİN
F. culmorum'a KARŞI ANTİFUNGAL ETKİNLİĞİ,
BAKTERİLERDEN ELDE EDİLEN
KİTİNAZ ENZİMİNİN KİSİMİ SAFLAŞTIRILMASI VE
BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Merve ŞENOL

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

***P. fluorescens* VE *B. subtilis* BAKTERİLERİNİN *F. culmorum*'a KARŞI ANTİFUNGAL ETKİNLİĞİ, BAKTERİLERDEN ELDE EDİLEN KİTİNAZ ENZİMİNİN KİSİMİ SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında, Merve ŞENOL tarafından hazırlanan bu çalışma 21/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu** (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Bülent ÇETİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emine ORHAN

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***P. fluorescens* VE *B. subtilis* BAKTERİLERİNİN *F. culmorum*'a KARŞI ANTİFUNGAL ETKİNLİĞİ, BAKTERİLERDEN ELDE EDİLEN KİTİNAZ ENZİMİNİN KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Merve ŞENOL

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Mantarların hücre duvarları, böceklerin ve diğer artropodların dış iskeletleri, krustase kabuklarının temel yapısal bileşeni olan kitini parçalama yeteneğine sahip kitinaz enzimleri hem bitki patojeni olan mantarlara karşı fungusit hem de zararlı böceklere karşı insektisit olarak biyolojik amaçlı kullanılabilir. Mantarların hücre duvarları, böceklerin ve diğer artropodların dış iskeletleri, krustase kabuklarının temel yapısal bileşeni olan kitini parçalama yeteneğine sahip kitinaz enzimleri hem bitki patojeni olan mantarlara karşı fungusit hem de zararlı böceklere karşı insektisit olarak biyolojik amaçlı kullanılabilir.

Bu çalışmada ülkemizdeki çeşitli kültür ve yabani bitkilerin toprak üstü aksamı veya kök rizosferinden izole edilen bakteri kültürlerinden, tütünde yapılan aşırı duyarlılık test sonuçlarında bitki patojeni olmadıkları teyit edilen 158 izolat seçilip patojen fungus olarak sebzelerde kök çürüklüğüne neden olan *Fusarium culmorum*'a karşı antifungal aktivite testi yapılmıştır. Antifungal aktiviteye sahip olan 31 izolata kitinaz enzimi aktivitesi testi yapılarak içlerinden en yüksek aktivite gösteren *Pseudomonas fluorescens* MF-1 ve *Bacillus subtilis* TV-125A izolata seçilmiştir. Bu iki izolata ürettikleri kitinaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi metoduyla kısmi saflaştırılmıştır. Kısmi saflaştırılan enzimlere optimum pH ve optimum sıcaklık analizleri yapılmıştır.

Sonuç olarak *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolatında %0-20 çöktürme aralığında %30,8 verimle 23,34 kat ve *Bacillus subtilis* TV-125A izolatından %0-20 çöktürme aralığında %15,7 verimle 22,34 kat kısmi saflaştırma yapılmış ve saflaştırılan enzimlerdeki optimum aktivite pH 4,0'de ve 50°C sıcaklıkta gözlenmiştir. *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolata pH 11,0'de %36 aktivitesini korurken, *Bacillus subtilis* TV-125A izolata aktivitesinin %71'ini koruduğu saptanmıştır. Ayrıca *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolatının 80°C'de %50 aktivitesini korurken, *Bacillus subtilis* TV-125A izolatının ise %42 aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

2014, 64 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Fusarium culmorum*, kitinaz enzimi

ABSTRACT

MS Thesis

THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *P. fluorescens* AND *B. subtilis* BACTERIES AGAINST TO *F. culmorum*, PARTIAL PURIFICATION OF CHITINASE ENZYME OBTAINED FROM THESE BACTERIES AND DETERMINING OF SOME KINETICS PROPERTIES

Merve ŞENOL

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Chitinase is capable of degrading chitin, is the basic structural component of cell walls of fungal, exoskeletons of insects and other arthropods and crustaceans shells. These chitinase enzymes may use for biological purposes as both fungicides against to plant pathogenic fungi and insecticides against to insect pests

In this study, the antifungal activity test was made to 158 isolates isolated from various cultures and aboveground parts or root rhizosphere of wild plant in our country, against to pathogenic fungi *Fusarium culmorum*, caused to root rot in vegetables. The chitinase enzyme activity test was made to 31 isolates which have antifungal activity, then *Pseudomonas flourescens* MF-1 and *Bacillus subtilis* TV-125A, had the highest activity was selected. The chitinase enzymes produced by these two isolates were purified by ammonium sulfate precipitation method. The optimum pH and temperature tests were made to partial purified enzymes.

As a result of, the partial purified was made to *Pseudomonas fluorescens* MF-1 and *Bacillus subtilis* TV-125A isolates in the range of precipitation 0-20% with yield of 30,8% and 15,7%, 23,34 and 22,34 times, respectively. The optimum activity of purified enzymes was determined at pH 4,0 and temperature of 50°C. *Pseudomonas fluorescens* MF-1 and *Bacillus subtilis* TV-125A isolates protected 36% and 71% of enzyme activity at pH 11,0, respectively. Besides, it was determined that *Pseudomonas fluorescens* MF-1 and *Bacillus subtilis* TV-125A isolates protected 50% and 42% of enzyme activity at temperature of 80°C, respectively.

2014, 64 pages

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Fusarium culmorum*, chitinase enzyme

TEŞEKKÜR

Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırladığım bu çalışmada, bilgi ve tecrübeleriyle bana ışık tutan ve araştırmalarımı yönlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a, Sayın Doç. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na ve Sayın Doç. Dr. Recep KOTAN'a sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımda bana, gelişmiş laboratuvar imkanları ile teknik destek sağlayan Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü ve Erzurum Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme ve Kimya Teknolojisi Bölümü yöneticileri, öğretim üyeleri ve tüm teknik personellerine teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım süresince, göstermiş olduğu büyük sabır ve özveriyle bana destek olan hayat arkadaşım Sayın Arş. Gör. Türkay KOTAN'a ve varlıklarından ötürü gurur duyarak kendimi şanslı hissettiğim, manevi destekleri için her zaman minnettar olduğum biricik aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Merve ŞENOL

Ocak 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimlerin Tarihçesi	2
1.2. Enzimlerin Yapısı	3
1.3. Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler	5
1.3.1. Sıcaklık	5
1.3.2. Süre	6
1.3.3. pH	6
1.3.4. Substrat konsantrasyonu	7
1.3.5. Enzim konsantrasyonu	8
1.3.6. Enzim inhibitörleri	8
1.3.6.a. Tersinir (geri dönüşümlü) inhibitörler	8
1.3.6.b. Tersinmez (geri dönüşümsüz) inhibitörler	10
1.3.6.c. Allosterik inhibitörler	11
1.3.7. Aktivatörler	11
1.4. Enzimlerin Sınıflandırılması	11
1.4.1. Enzimlerin sınıflandırılması ve numaralandırılması	12
1.5. Kitin	13
1.5.1. Kitinin elde edilmesi	15
1.6. Kitosan	17
1.6.1. Kitinden kimyasal yolla kitosan eldesi	18
1.7. Kitin, Kitosan ve Türevlerinin Kullanım Alanları	20
1.8. Kitinaz Enzimi	21
1.8.1. Kitinin enzimatik hidrolizi	22

1.8.2. Kitinaz enziminin kullanım alanları	23
1.9. Çalışmanın Amacı	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri izolatları	33
3.1.2. Çalışmada kullanılan patojen fungus izolatu	34
3.1.3. Enzim aktivitesi için kullanılan çözeltiler	35
3.1.3.a. Substratın hazırlanışı	35
3.1.3.b. Renklendirme çözeltilerinin hazırlanışı	35
3.1.4. Optimum pH aktivitesi için kullanılan tamponlar	35
3.1.4.a. Sodyum asetat tamponu	35
3.1.4.b. Sodyum sitrat tamponu	36
3.1.4.c. Tris hidroklorik asit (Tris-HCl) tampon çözeltisi	36
3.1.4.d. Sodyum karbonat tamponu	36
3.2. Yöntem	36
3.2.1. Çalışmada kullanılan bakteri ve fungus kültürlerinin muhafazası	36
3.2.2. Bakteri izolatlarının petride antifungal aktivitelerinin belirlenmesi	37
3.2.3. Kitinaz enzimi için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	37
3.2.4. Enzim aktivitesinin ölçülmesi	39
3.2.5. Enzimin optimum pH değerinin saptanması	40
3.2.6. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması	40
3.2.7. Bradford metodu ile protein miktarı tayini	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	42
4.1. <i>In-vitro</i> Petri Denemelerinin Sonuçları	42
4.2. Protein Tayini İçin Kalibrasyon Grafiği	46
4.3. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları	47
4.4. <i>Pseudomonas fluorescens</i> MF-1 ve <i>Bacillus subtilis</i> TV-125A'dan Üretilip Saflaştırılan Kitinaz Enziminin Optimum pH Sonuçları	49
4.5. <i>Pseudomonas fluorescens</i> MF-1 ve <i>Bacillus subtilis</i> TV-125A'dan Elde Edilen Kitinaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları	51
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	53

KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	65

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

β	Beta
chi	Kitinaz
DNA	Deoksiribonukleik Asit
DNS	Dinitrosalisilik Asit
EC	Enzim Komisyonu
GlcNAc	N-asetilglukozamin
GlcNAc-1P	N-asetilglukozamin-1-fosfat
GlcNAc-6P	N-asetilglukozamin-6-fosfat
GlcNAcase β -	N-Asetilglukozaminidaz
kDa	Kilo dalton
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
nm	Nanometre
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Potato dextrose agar (Patates dekstroz agar)
rpm	Dakikada devir sayısı
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
sp.	Species (tür, tekil)
U/mL	Units per milliliter
Vmax	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Enzimin yapısı	4
Şekil 1.2.	Anahtar kilit modeli ve İndüklenmiş uyum modeli	5
Şekil 1.3.	Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi	6
Şekil 1.4.	Sürenin enzim aktivitesine etkisi	6
Şekil 1.5.	pH'nın enzim aktivitesine etkisi	7
Şekil 1.6.	Substratın enzim aktivitesine etkisi	7
Şekil 1.7.	Enzim konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	8
Şekil 1.8.	Kompetatif inhibitör	9
Şekil 1.9.	Non-kompetatif inhibitör	10
Şekil 1.10.	Un-kompetatif inhibitör	10
Şekil 1.11.	Kitinin kimyasal yapısı	14
Şekil 1.12.	Deniz hayvanı kabukluları ve mantarlardan kitin eldesi	16
Şekil 1.13.	Selülozun kimyasal yapısı	17
Şekil 1.14.	Kitosanın kimyasal yapısı	17
Şekil 1.15.	Kitinin deasetilasyonu ile kitosan eldesi	19
Şekil 1.16.	Kitinaz enziminin 3 boyutlu yapısı	21
Şekil 1.17.	Kitinin enzimatik hidrolizi	23
Şekil 3.1.	<i>F. culmorum</i> Ant-17 izolatının patojenite testinden bir görünüm	34
Şekil 3.2.	Bradford reaksiyonu	41
Şekil 4.1.	Bakteri izolatlarının Petri denemelerinde patojen fungusun gelişimine etkisi	43
Şekil 4.2.	Bakteri izolatlarından <i>Bacillus subtilis</i> TV-125A'nın petride kitinaz aktivitesinin belirlenmesi	46
Şekil 4.3.	Bradford metoduyla protein tayini için kalibrasyon grafiği	47
Şekil 4.4.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> MF-1'den elde edilen kitinaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	50
Şekil 4.5.	<i>Bacillus subtilis</i> TV-125A'dan elde edilen kitinaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	50

- Şekil 4.6.** *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolatı’ndan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan kitinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi 51
- Şekil 4.7.** *Bacillus subtilis* TV-125A’ndan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan kitinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi 52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Farklı organizmalara ait kitin oranları	15
Çizelge 1.2. Kitin, kitosan ve türevlerinin kullanım alanları	20
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri türleri ve bu türlere ait toplam izolat sayıları	34
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan bakteri türlerinin <i>Fusarium culmorum</i> 'a karşı test edilen izolatlarının etkili ve etkisiz izolat sayıları ve antifungal aktivite testinde fungal diskin çap aralığı	42
Çizelge 4.2. Antifungal petri denemelerinde etkili bulunan izolatların azot fiksasyonu ve fosfatı çözebilme özellikleri, patojen fungusun disk çapı, petride kitinaz aktivite test sonucu ve enzim aktivite değerleri	44
Çizelge 4.3. <i>Pseudomonas fluorescens</i> MF-1 için $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürme aralıkları ve bu aralıklarda belirlenen enzim aktivite değerleri	47
Çizelge 4.4. <i>Bacillus subtilis</i> TV-125A için $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürme aralıkları ve bu aralıklarda belirlenen enzim aktivite değerleri	48
Çizelge 4.5. <i>Pseudomonas fluorescens</i> MF-1'den kitinaz enziminin saflaştırma basamakları	48
Çizelge 4.6. <i>Bacillus subtilis</i> TV-125A'dan kitinaz enziminin saflaştırma basamakları	49

1. GİRİŞ

Bir kimyasal reaksiyonu başlatan ve hızlandıran ancak kendisi reaksiyona girdiği gibi çıkan maddeye katalizör denir. Enzimlerde biyokimyasal reaksiyonları başlatan, hızlandıran ve reaksiyonda hiçbir değişikliğe uğramadan çıkan katalizör bileşikleridir. Enzimler katalizledikleri reaksiyonlarda %100'lük ürün verimi sağlar ve hiçbir yan ürünün oluşumuna fırsat vermezler. Böylece organizma için gerekli enerji temin edilirken, metabolizmada potansiyel toksik bileşiklerin oluşmasına izin verilmez. Enzimler substrat için çok yüksek spesifikliğe sahiptir. Bir enzim birbirine benzer substratın bir grubu ile reaksiyona girebilirken, başka bir enzim tek bir molekül türü ile reaksiyona girebilir (Gökçalp vd 2002).

Enzimlerin genel özelliklerini şu şekilde açıklanabilir;

1. Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadırlar.
2. Benzer tür reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir.
3. Bir enzim daima tek çeşit veya aynı tip reaksiyonları katalizler.
4. Katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini azaltırlar.
5. Enzimler gerçekleşecek reaksiyonun çabuk dengeye gelmesini sağlarlar.
6. Enzimler canlı ortamda olduğu gibi cansız ortamda da görev alırlar (Kılınç 2011).

Metabolizmada enzimler yapım, yıkım, hidroliz gibi olaylarda görev alırlar. Enzimlerin özel reaksiyonları katalizleyebilmeleri pH, sıcaklık, süre, substrat ve inorganik iyonların konsantrasyonu, aktivatör veya koenzimlerin varlığı ve reaksiyona bağlı ürünlerin konsantrasyon niteliğine bağlıdır (Yakupoglu 2009).

Enzimlerin; gıda sanayinde, kimya endüstrisinde, ziraat alanında ve hatta biyolojik savaşlarda kullanımı oldukça geniş bir yer tutar. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler birçok avantajları nedeniyle genelde mikrobiyal kökenli enzimlerdir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürünler oluşturmamaları,

daha stabil ve ucuz olmaları ve bir üretim prosesinde çok fazla miktarda üretilmeleri mümkündür (Zeman and McCrea 1985; Wiseman 1987).

Mikroorganizmalar hayati fonksiyonları devam ettirebilmek için birçok enzim sentezlerler. Bu enzimlerin çoğu, hücrenin içinde çevreden korunmuş olarak iş görmektedir. Fakat bazıları hücrenin dışına salgılanarak etkinliğini gösterebilir. Bunlara ekstrasellüler enzimler denir. Ekstrasellüler enzimler, ortamda bulunan yüksek molekül ağırlıklı besin maddelerini hidroliz ederek mikroorganizma tarafından alınabilir forma dönüştürürler. Bu enzimlere genel olarak hidrolazlar denir. Ekstrasellüler enzimler mikroorganizmanın ürettiği/üretildiği ortama salındığı için, ortamın fiziksel ve kimyasal özelliklerine karşı kendisini stabil kılan bazı özelliklere sahip olması gerekir. Mikroorganizma için gerekli ise fazla miktarda üretilebilir. Söz konusu enzimin substratı ortamda bulunursa enzim üretimi indüklenebilir. Bu özelliği sayesinde, ekstrasellüler enzimler endüstriyel alanlarda kullanılmak için uygun ve vazgeçilmez moleküller haline gelmiştir. Günümüzde mikrobiyal enzimlerin pek çoğu önemli araştırma konusu haline gelmiş, dünyanın hemen her yerinde üretilmeye, sanayi, endüstri alanında kullanılmaya başlanmıştır (Kalisz 1988; Kuzu 2008).

1.1. Enzimlerin Tarihçesi

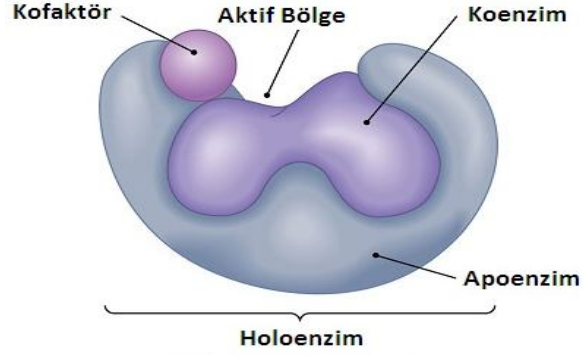
Enzimler ilk biyoteknolojik işlemler olarak kabul edilen; ekmek, yoğurt, bira, şarap, peynir gibi ürünlerin hazırlanmasında bilinmeden kullanılmışlardır. Geçtiğimiz yüzyıldan itibaren ise enzim alanında yapılan çalışmalar arttırılmıştır. Spallanzani (1783) tarafından atmaca mide suyunun eti yumuşattığının bulunması, Kirchoff (1811)'un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi, Robiquet, Boutron ve Chaland (1830)'ın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini keşfetmeleri, Payen ve Persoz (1833)'un nişastayı şekere dönüştüren bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmeleri ve hücre dışı enzimatik aktivitenin varlığının anlaşılması enzimoloji alanında yapılan ilk temel çalışmalar olmuştur (Aehle 2004).

Enzimler keşfedildikleri ilk yıllarda ferment olarak adlandırılmış olsa da ilk kez Berzelius (1838) enzimler için katalizör (biyokatalizör) ifadesini kullanmış ve ardından Künhe (1878) enzim terimini kullanan ilk kişi olmuştur. 1800'lü yılların sonuna doğru Emil Fischer enzimlerin substratlarına olan özgünlüklerini ortaya koyarak anahtar-kilit modelini tanımlamış ve bazı temel kavramların enzimoloji alanına girmesini sağlamıştır. Summer (1926)'ın kristalize formda üreaz enzimini ilk olarak elde etmesiyle enzim saflaştırma ve kristallendirme çalışmaları hız kazanmıştır. 1950 yılına dek pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi proteolitik enzimlerin bulunduğu pek çok enzim saflaştırılarak kristalize edilmiştir. Svedberg tarafından gerçekleştirilen ultrasantrifüj tekniği ile enzimlerin molekül kütlelerine göre ayırımının yapılabileceğinin belirtilmesi, 1960 yılında ribonükleazın aminoasit dizisinin aydınlatılması, 1965 yılında lizozimin 3 boyutlu yapısının X-ışınları kristalografisi ile belirlenmesi enzimlerin kimyası ve yapısı alanındaki ilk çalışmalar olmuştur. 1950-1960 yılları arasında yapılan enzimolojik çalışmalardan enzimlerin yapısal esnekliği ile ilgili bilgiler ortaya çıkmış ve 1958 yılında Koshland, enzimlerin katalitik gücü ve özgünlüğünü açıklamak üzere indüklenmiş uyum (induced fit) modelini önermiştir. Aminoasit prekürsörlerinden ribonükleaz enziminin kimyasal olarak sentezi ilk kez Merrifield ve arkadaşları (1969) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu alanda yapılan önemli bir gelişme olmamasına rağmen hazırlanan preparatın katalitik aktivitesi ve kimyasal saflığı oldukça düşük olmuştur (Yakupoglu 2009). Bugünde geçerliliğini sürdüren enzim kinetiği konusu, Michaelis ve Menten tarafından (1913) temeller üzerine oturtulmuştur.

1.2. Enzimlerin Yapısı

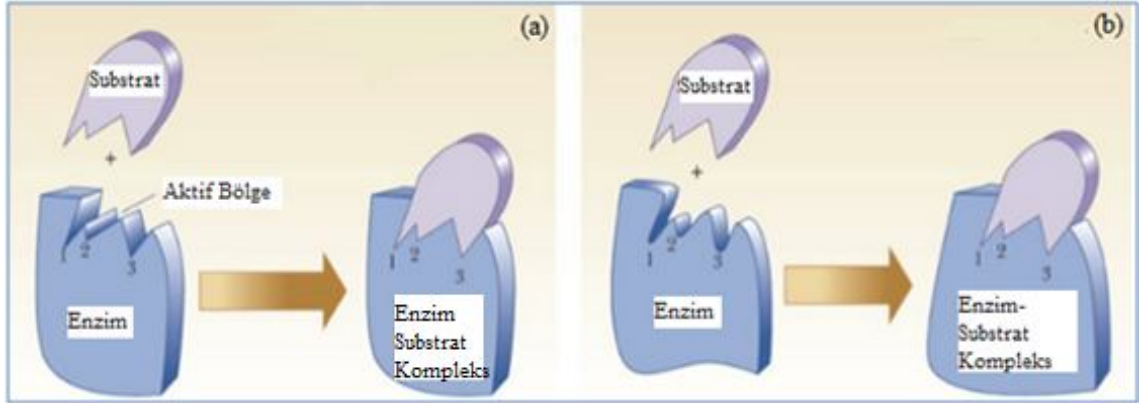
Enzimlerin kimyasal yapıları, protein ve protein olmayan mineral maddeler veya vitamin kısmından oluşmaktadır. Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için gerekli olan, ve protein yapıda olmayıp genellikle metal iyonlarını içeren yan gruplarına kofaktör, kompleks organik bileşik içeren yan gruplarına da koenzim denir. Koenzimlerin enzim proteinine çok sıkı bir şekilde, kovalent olarak bağlı olup enzim proteininden ayrılmayanları prostetik grup olarak adlandırılırlar. Enzimlerin sadece protein yapıdan

oluşmuş ve kofaktör içermeyen inaktif kısmına apoenzim, kofaktörleri ve koenzimleri içeren aktif kısmına haloenzim denir (Kuzu 2008).



Şekil 1.1. Enzimin yapısı (Sarıbuğa 2013)

Enzimlerin etki ettiği maddelere substrat, reaksiyon sonunda meydana gelen maddeye ise “ürün” adı verilir. Enzim ile substratın birbirine bağlanması ile ilgili iki model ileri sürülmüştür. 1894’te Emil Fischer tarafından ileri sürülen anahtar kilit modelinde, substratın enzimin aktif bölgesine bağlanırken yapısal olarak uygun şekilde anahtar kilit gibi birbirine bağlandığı kabul edilir. 1958’de Daniel Koshland tarafından ileri sürülen indüklenmiş-uyum modelinde ise; enzim substratı olmadığında serbest halde bulunur. Substrat varlığında, enzimin aktif merkezi biçimsel değişikliğe uğrayarak substrata uygun olarak şekillenir. Enzim substratına geçici olarak aktif bölgeden bağlanır ve substrat-enzim bileşiği (SE) oluşur. Daha sonra substrat ürüne veya ürünlere dönüşür. Enzimler ise reaksiyondan değişmeden çıktıkları için tekrar tekrar kullanılabilir (Nelson and Cox 2004; Açıklık vd 2006).



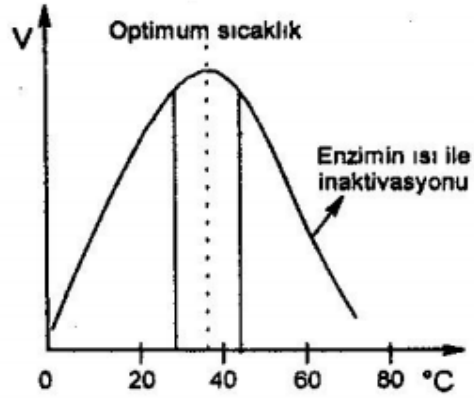
Şekil 1.2. (a) Anahtar kilit modeli – (b) İndüklenmiş uyum modeli

1.3. Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Enzim aktivitesini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler; pH, sıcaklık, reaksiyon süresi, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, su aktivitesi, enzim inhibitörleri, enzim aktivatörleri, reaksiyon ürünleri, basınç, radyasyon ve ışık gibi çeşitli fiziksel faktörlerin yanı sıra hormonlar gibi çeşitli kimyasal faktörlerde bulunmaktadır. Sıcaklık, süre, pH, enzim konsantrasyonu ve substrat konsantrasyonu bu faktörlerden başlıcaları olup, alt bölümde ele alınmıştır. Çalışmada, bunlar dışında enzim aktivitesini etkileyen faktörlerin, deneysel ortamda sabit olduğu kabulü yapılmıştır (Sarıbuğa 2013).

1.3.1. Sıcaklık

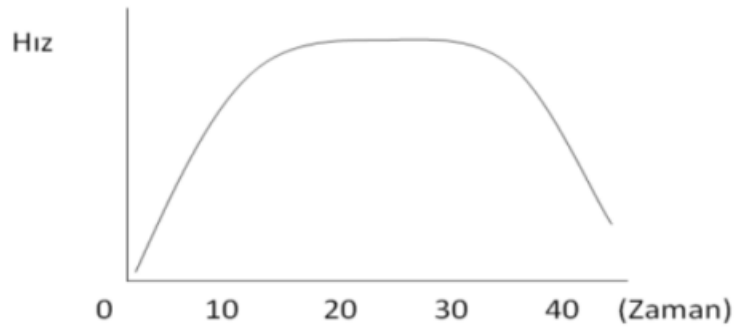
Enzimatik tepkimelerde sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışmanın artışına bağlı olarak genellikle tepkimenin hızı artmaktadır. Tepkime hızının en yüksek düzeye ulaştığı sıcaklığa optimum sıcaklık denir. Enzimler protein yapısında oldukları için optimum sıcaklık üzerinde enzim denatüre olmakta ve tepkime hızı azalarak sıfıra inmektedir (Batur 2012).



Şekil 1.3. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi (Batur 2012)

1.3.2. Süre

Şekil 1.4'te de görüldüğü gibi enzim reaksiyonlarında hız zamanla azalmaktadır. Çünkü ortamda bulunan substrat azalır veya tükenir ve enzim zamanla denatüre olabilir. Bu yüzden genellikle enzim ölçümleri başlangıç döneminde olmaktadır (Mert 2006).

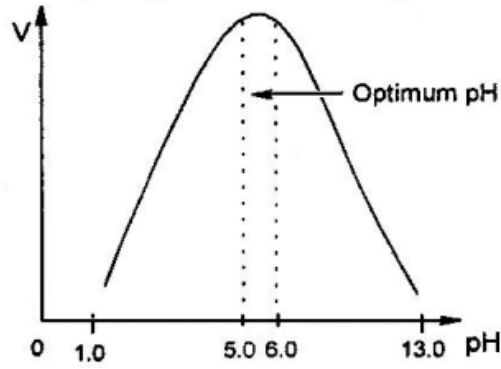


Şekil 1.4. Sürenin enzim aktivitesine etkisi (Batur 2012)

1.3.3. pH

Ortam pH'sı enzim aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH'ya optimum pH denir. Şekil 1.5'te de görüldüğü gibi enzimlerin

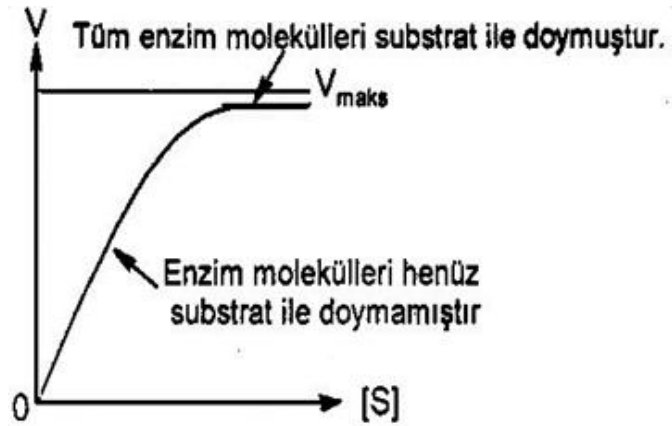
tipik pH eğrilerinde enzim hızı optimum pH'nın her iki tarafında da giderek azalmaktadır (Anonim 2007).



Şekil 1.5. pH'nın enzim aktivitesine etkisi (Batur 2012)

1.3.4. Substrat konsantrasyonu

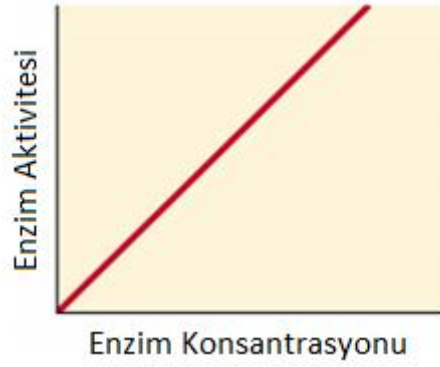
Substrat konsantrasyonunun artırılması, enzimatik reaksiyonu başlangıçta doğrusal olarak artırır. Ancak substrat ilave edildikçe hız giderek daha az artar. Maksimum kapasiteye ulaşıldığında enzimde substrat bağlayacak tüm boş yerler dolduğundan, eklenen substrat artık enzime bağlanamaz ve enzimatik tepkimenin hızı değişmez (Mert 2006).



Şekil 1.6. Substratın enzim aktivitesine etkisi (Mert 2006)

1.3.5. Enzim konsantrasyonu

Ortamda bulunan enzim konsantrasyonunun enzimatik reaksiyonlar hızına etkisi doğrusaldır. Reaksiyonun gerçekleştiği yerde ne kadar çok miktarda enzim varsa ve çalışıyorsa, yeterli substrat olduğu sürece reaksiyonda hızlanarak devam eder (Anonim 2007).



Şekil 1.7. Enzim konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi (Batur 2012)

1.3.6. Enzim inhibitörleri

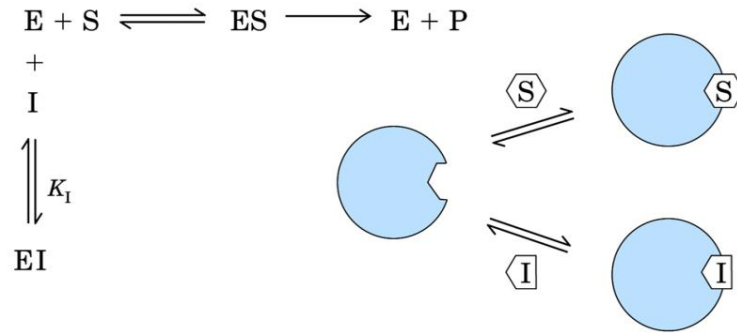
Enzimin katalitik aktivitesini azaltan maddelere enzim inhibitörleri denir. Enzim inhibitörleri doğal veya yapay maddelerdir. Enzim inhibitörleri: tersinir-geri dönüşümlü (reversible), tersinmez-geri dönüşümsüz (irreversible) ve allosterik inhibitörler olmak üzere 3'e ayrılır (Sarıbuğa 2013).

1.3.6.a. Tersinir (geri dönüşümlü) inhibitörler

Tersinir inhibitörler enzimle çok kısa sürede (saniyenin binde biri düzeyinde) kovalent olmayan, difüzyon kontrollü denge kompleksleri yaparlar ve oluşan kompleksler diyaliz

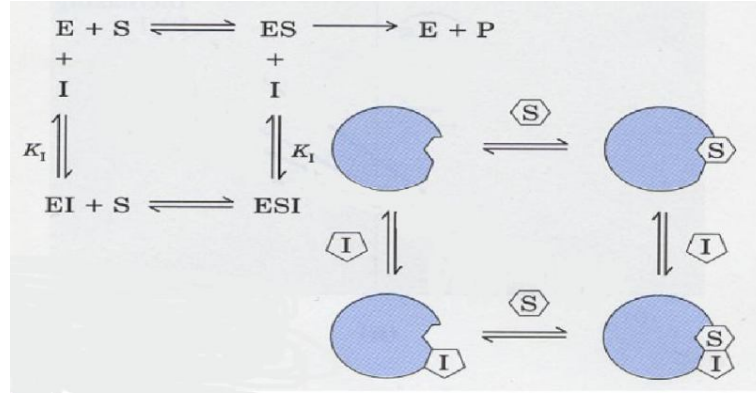
veya jel filtrasyonla kolayca ayrılabilir ve enzim tekrar aktif şekline dönüşebilmektedir. Tersinir inhibitörler 3'e ayrılır;

- 1. Kompetatif (yarışmalı) inhibitörler:** Enzimin aktif merkezi ile geri dönüşümlü olarak birleşebilmektedir. Ancak oluşan enzim inhibitör (EI) kompleksinden ürün oluşumu mümkün değildir. Ortamda yarışmalı inhibitör bulunduğunda, bu inhibitörle substrat arasında enzimle birleşme yönünde bir yarışma olur. Bu durumda ortamdaki enzim moleküllerinin bir kısmı substrat ile birleşmekte ve buradan ürün oluşumu gerçekleşmekte, bir kısım enzim ise inhibitör ile birleşmekte ve ürün elde edilememektedir (Mert 2006).



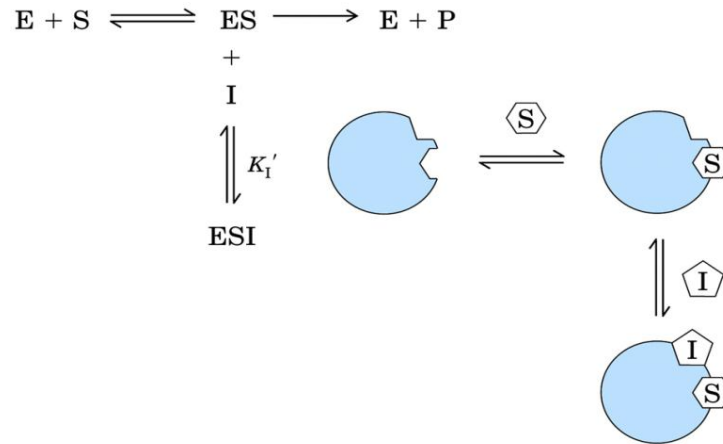
Şekil 1.8. Kompetatif inhibitör

- 2. Non-kompetitif (yarışmasız) inhibitörler:** Enzime aktif merkez dışında diğer bir bölge üzerinden bağlanmaktadır. Bu nedenle, substrat ile inhibitör arasında enzimle kompleks oluşturma yönünde bir yarışma olmaz. Bu durumda da, ortamdaki enzimlerin bir kısmı ES ve EI kompleksleri halinde ise bir kısım enzim E,I,S kompleksi oluşturmaktadır. E,I,S kompleksinden ürüne geçilememektedir. Ancak enzimin geri dönüşümlü olarak bu kompleksten ayrılarak tekrar serbest hale geçme ve substrat ile birleşip ürün oluşturma şansı vardır (Anonim 2007).



Şekil 1.9. Non-kompetatif inhibitör

3. **Un-kompetatif (sınırlı yarışmalı) inhibitörler:** Sınırlı yarışmalı inhibitörler ES kompleksine bağlanarak inhibisyona neden olur. İnhibitörün direkt olarak enzime bağlanması söz konusu değildir (Anonim 2007).



Şekil 1.10. Un-kompetatif inhibitör

1.3.6.b. Tersinmez (geri dönüşümsüz) inhibitörler

Tersinmez inhibitörler enzime kovalent bağla bağlandığı için EI kompleksinden tekrar enzime dönüş veya ürün oluşumu söz konusu değildir. Ürün ancak ortamda serbest enzimle birleşebilen substrat üzerinden olabilir. Tersinmez inhibitör enzime aktif

bölgeden veya başka bir bölgeden bağlanabilir. Tersinmez inhibitörler; Hg^{+2} , Ag^{+2} gibi ağır metal iyonları, H_2O_2 gibi oksidan maddeler olabilir.

1.3.6.c. Allosterik inhibitörler

Allosterik inhibitörler enzimlerin modifikatör bölgesine bağlanır. Bu bağlanma sonucunda, enzimin aktif merkezinde substratın bağlanmasına imkan vermeyen şekilsel bir değişim meydana gelir ve buna bağlı olarak da ES kompleksi oluşamaz.

1.3.7. Aktivatörler

Bazı enzimler aktivitelerini artırmak için aktivatör adı verilen iyonlar veya küçük moleküllere ihtiyaç duymaktadırlar. Aktivatörler genellikle metal iyonlarıdır. Bunlar kofaktörlerin aksine olarak kataliz olayına her zaman katılmazlar. Aktivatörlerin bir kısmı yalnızca substratla, diğer bir kısmı ise enzimle birleşerek aktivatör rolü oynar. Enzimle birleşen aktivatörler küçük metal iyonlarıdır. K^+ , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} ve Co^{+2} gibi katyonların yanı sıra Cl^- , Br^- , F^- , I^- ve OH^- vb. gibi anyonlar da aktivatördür (Anonim 2007).

1.4. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimlerin sayısı 1950'li yılların sonuna kadar çok hızlı artış göstermiş ve birçok kişi aynı enzime farklı farklı isimler vermişlerdir. Bunun yanı sıra adlandırılması yapılan birçok enzimin katalizlediği reaksiyon hakkında herhangi bir bilgi içermemesi de karmaşayı iyice arttırmaktaydı. Bu yüzden 1956 yılında Uluslararası Enzim Komisyonu (International Commission on Enzyme) bu karışıklığın düzelmesi adına kurulmuştur. Enzimlerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi için kabul edilen sistem 3 genel prensibi içermektedir (Aygan 2008).

1. Birincisi, -az (-ase) eki ile sonlanan enzim isimleri, tek enzimler için kullanılmalıdır. Bu durum birden fazla sistem içeren enzimler için kullanılmamalıdır.
2. İkincisi, enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre sınıflandırılır ve adlandırılırlar.
3. Üçüncüsü ise, katalizlenen reaksiyonların tipine göre adlandırılır ve sınıflandırılır. Bu sistem enzim komisyonu (E.C.) tarafından belirlenen kod numaraları kullanılarak enzimlerin açık bir şekilde tanımlanmalarını sağlar (Aygan 2008).

Bir enzimin genellikle iki ismi mevcuttur. Biri sistematik ya da tavsiye edilen, diğeri ise yaygın olarak kullanılan, daha kısa ve kolayca uygulanan genel ismidir. Bir enzim, sistematik ismi ve E.C. kod numarası ile tanımlandıktan sonra önerilen isim herhangi bir karışıklık olmaksızın sorunsuzca kullanılabilir. Bu tür yaklaşımlar literatürlerde yaygın olarak uygulanmaktadır (Aehle 2004).

1.4.1. Enzimlerin sınıflandırılması ve numaralandırılması

Enzim komisyonunun raporuna göre kod numara sistemi geliştirildi. E.C. ön eki ile başlayan numaralar noktalarla birbirinden ayrılmış 4 temel ögeyi ifade etmektedir.

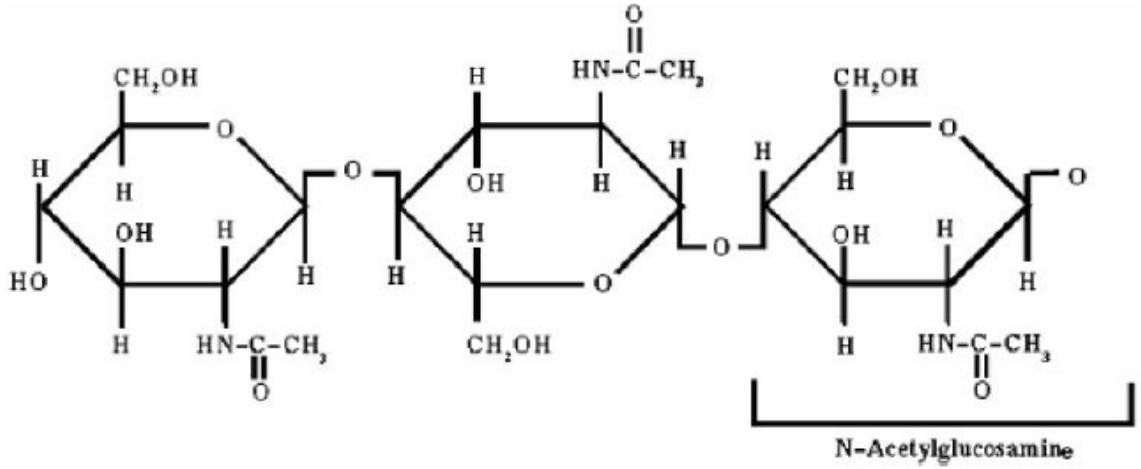
1. Birinci rakam, enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu belirtir.
2. İkinci rakam, enzimin alt sınıfını (Subclass) belirtir.
3. Üçüncü rakam, ikinci alt sınıfı (Sub-Subclass) ifade eder.
4. Dördüncü yani son rakam ise sub-subclass da bulunan enzimin seri numarasını ifade eder.

Bu sisteme göre ilk rakamda belirtilen enzimlerin katalizledikleri tepkimenin tipine göre 6 farklı gruba ayrılmışlardır. Bunlar(Aehle 2004):

- 1. Oksidoredüktazlar:** Bu sınıftaki enzimler oksidasyon – redüksiyon reaksiyonlarını katalizler.
- 2. Transferazlar:** Fonksiyonel grupların veya radikallerin transfer tepkimelerini katalizleyen enzimler bu sınıfta bulunur.
- 3. Hidrolazlar:** Substratın yapısındaki bağlara göre hidroliz tepkimesini katalizleyen enzimlerdir.
- 4. Liyazlar:** Bu bölümdeki enzimler substrattan bazı grupları hidrolitik olmayan mekanizmalarla ayırır. C – C, C – S ve C – N bağlarının parçalanmasında görev yapmaktadır.
- 5. İzomerazlar:** Optik veya geometrik izomerlerin rasemizasyonu tepkimelerini katalize eden enzim sınıfıdır.
- 6. Ligazlar:** İki metabolitin bağlanmasını katalize eder ve bu sayede daha büyük molekülün oluşmasını katalize eden enzim sınıfıdır.

1.5. Kitin

Kitin N-asetil glukozamin rezidülerinin β ,1-4 bağlanması ile oluşmuş bir polisakkarittir. En çok görülen doğal polimerden olan kitin formları uzun düz zincirlerden oluşmuş bir yapıdadır. Bu nedenle selüloza benzer bir özellik gösterir ancak yapısında selülozdan farklı olarak hidroksil grupları yerine asetilasyona uğramış amino gruplar bulundurur (Stryer 1988; Madigan *et al.* 1997; Kuzu 2008). Sistematik adı (1,4)-2-asetamid-2-deoksi- β -D-glukan olan kitin doğada selülozdan sonra en çok bulunan ikinci biyopolimerdir (Deshpande 1986; Chen and Chang, 1994; Muzzarelli and Muzzarelli 1998; Tanaka *et al.* 2003).



Şekil 1.11. Kitinin kimyasal yapısı (Yakupoğlu 2009)

Kitin oligomerinin fonksiyonel özellikleri ve fizyolojik aktivitelerinin çoğu molekül ağırlığına ve zincir uzunluğuna bağlıdır (Shahidi *et al.* 1999). Doğal polisakkaritlerin çoğunun nötr ya da asidik olmasına karşın kitin baziktir. Kitin oldukça hidrofobiktir, suda ve organik çözücülerin çoğunda çözünmez. Mineral asitlerin sulu çözeltileriyle konjuge olan heksafloroizopropanolde, heksafloroasetonda, kloroalkollerde ve %5 lityum klorit içeren dimetilasetamidde çözünür (Kumar 2000; Çağlar 2005).

Mantarların hücre duvarları, böceklerin ve diğer artropodların dış iskeletleri, krustase kabuklarının temel yapısal bileşenidir (Gooday *et al.* 1980; Deshpande 1986; Flach *et al.* 1992; Cauchie 2002; Merzendorfer 2003; Adams 2004; Hoell *et al.* 2005). Nematodlar (yuvarlak kurtlar), karides, yengeç, ıstakoz gibi krustaseler, gelinböceği, kelebek, sivrisinek gibi artropodlar, midye, istiridye, salyangoz gibi mollusklar dahil olmak üzere mantar, alg gibi daha bir çok organizmada yaşamsal öneme sahip bir polisakkarittir (Gooday and Trinci 1980; Kramer and Koga 1986; No *et al.* 1989; Cabib *et al.* 1989; Cho *et al.* 1998; Kumar 2000; Cauchie 2002; Merzendorfer and Zimoch 2003; Adams 2004; Çağlar 2005). Çizelge 1.1'de farklı organizmalara ait kitin oranları gösterilmektedir.

Kitin, böceklerde kutikulan ve çoğu böceğin bağırsağını koruyan peritrofik membranın ana bileşenidir. Bağırsağı enfekte eden patojenlerin öncelikle bu kitince zengin bariyeri geçmeleri gerekmektedir (Shen and Jacobs-Lorena 1997; Sampson and Gooday 1998; Hoell *et al.* 2005; Yakupoğlu 2009). Aynı zamanda kitin böceklerin üst derilerinde, trake borularında ve kaslarında protein ve diğer komponentlerle birlikte bulunur (Kramer and Koga 1986).

Çizelge 1.1. Farklı organizmalara ait kitin oranları (Yakupoğlu 2009)

Organizma	Oran (%)
Mantar	5-20
Solucan	20-38
Ahtapot	3-20
Örümcek	38
Hamamböceği	35
İpekböceği	44
Yabani yengeç	69
Yenilebilen yengeç	70
Akrep	30
Su böceği	37

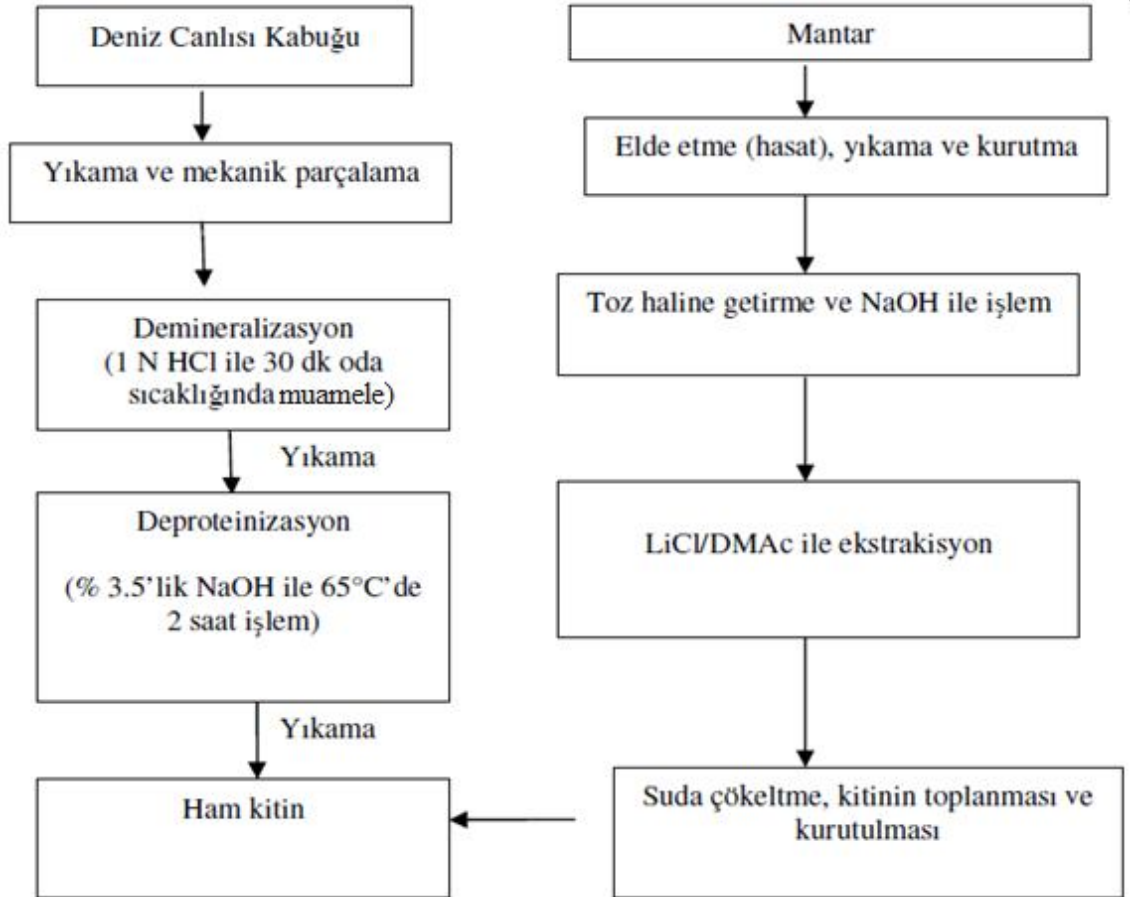
1.5.1. Kitinin elde edilmesi

Dünya yüzeyinde kabuklu hayvanların, yengeçlerin, istakozların, krillerin işlenmesinden oluşan katı atıklar kitinsel atıkların büyük bir miktarını oluşturur (Roy *et al.* 2003). Dünya çapında deniz atıklarından elde edilen kitinin 80.000 tondan daha fazla olduğu belirlenmiştir (Subasinghe 1995; Muzzarelli 1977).

Çizelge 1.1’de görüldüğü gibi mantar atıklarında bulunan kitinin miktarı, deniz kaynakları ile kıyaslandığında önemsenecek kadar az miktardadır (Muzzarelli 1977;

Patil *et al.* 2000). Ancak kitin ve kitosanın geniş kullanım alanları sebebiyle mantarlarında ticari olarak kullanımı yapılmaktadır (Muzzarelli *et al.* 1994).

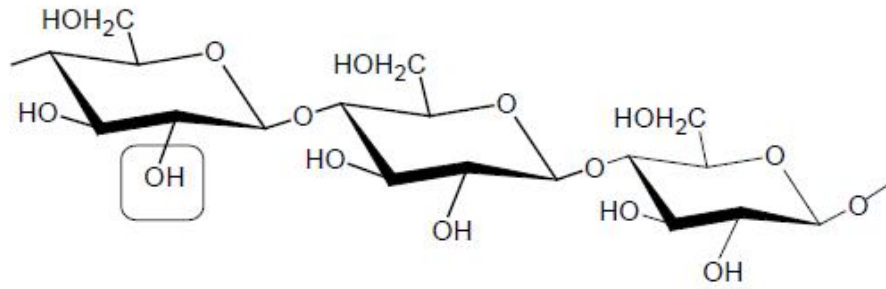
Son yıllarda atıkların yeniden değerlendirilmelerinin gündeme gelmesiyle birlikte, kabuklu su ürünleri çürümeye bırakılmak yerine, kimyasal veya biyolojik yöntemlerle yeniden değerlendirilmekte ve yeni ürünler elde edilmektedir. Bu şekilde edilen ürünlerin başında kitin gelmektedir (Demir ve Seventekin 2009). Şekil 1.12’de deniz hayvanı kabukluları ve mantarlardan kitin elde edilmesi gösterilmiştir.



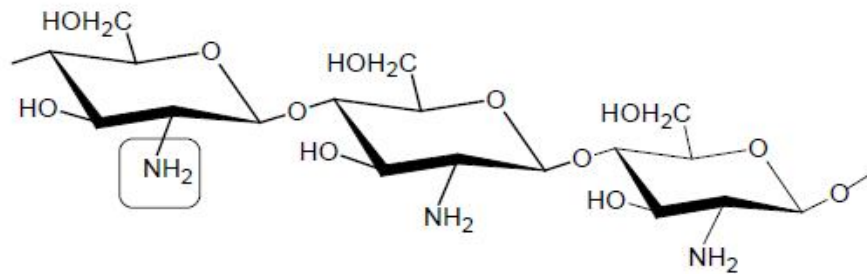
Şekil 1.12. Deniz hayvanı kabukluları ve mantarlardan kitin eldesi (Demir ve Seventekin 2009)

1.6. Kitosan

Kitosan, yengeç ve karides gibi kabuklu deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanatlarında, mantarların hücre duvarlarında gibi bölgelerde bulunan doğal bir polisakkarit olan kitinden kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak selüloza benzeyen ve doğada selülozdan sonra en sık rastlanan biyopolimerlerdendir (Shepherd *et al.* 1997; Terbojevich and Muzarelli 2000; Bostan *et al.* 2007). Kitosan kitinin tersine asidik solüsyonda çözünebilir. Şekil 1.14. ve Şekil 1.15’de görüldüğü gibi selülozun moleküler yapısına benzerlik göstermesine rağmen kitosan, kitinden daha önemlidir (Alyüz ve Veli 2005; Muşabak 2008; Kuzgun ve İnanlı 2013).



Şekil 1.13. Selülozun kimyasal yapısı



Şekil 1.14. Kitosanın kimyasal yapısı

Kitosanın kimyasal yapısı, poli-[b-(1,4)-2-amino-2-deoksi-b-D-glukopiranoz] şeklindedir. Kitin ve kitosan polisakkaritleri, kimyasal olarak selüloza benzemekle birlikte kendi aralarında birtakım farklılıklar göstermektedir. Selülozda, ikinci karbon atomuna bağlı hidroksil (-OH) grubu bulunurken, kitinde asetamid (-NHCOCH₃), kitosanda ise amin (-NH₂) grubu bulunmaktadır (Demir ve Seventekin 2009).

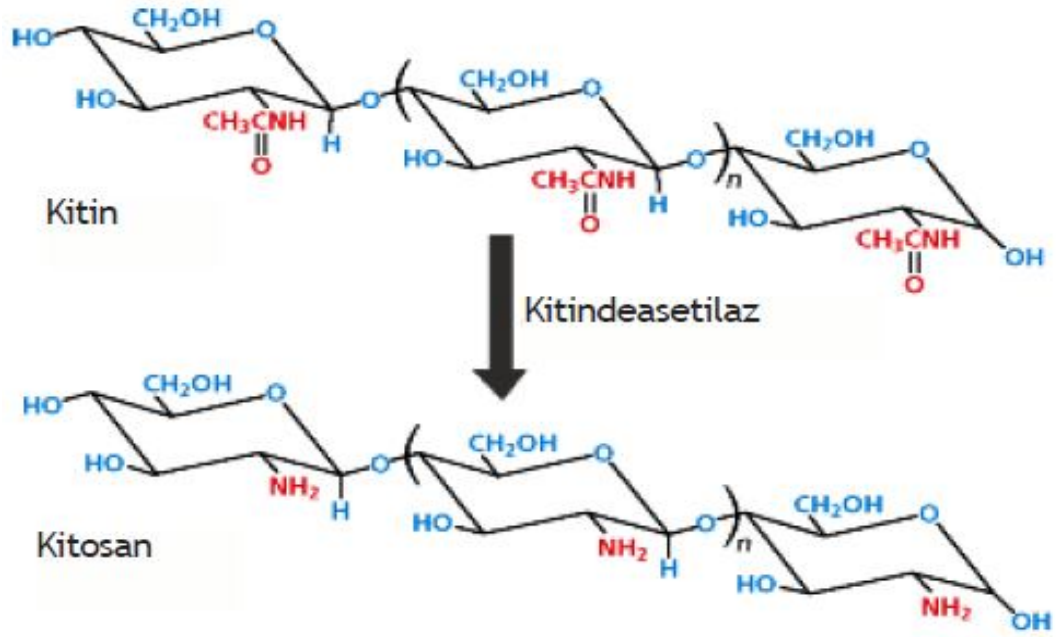
Kitosan, ilk kez 1811 yılında Henri Bracannot tarafından keşfedilmiştir. Bracannot, mantarlarda bulunan kitini sülfürik asitte çözmeye çalışmış ancak başarılı olamamıştır. 1894'de Hoppe-Seyler, kitini potasyum hidroksit içerisinde 180°C'de işleme sokmuş (deasetilasyon) ve asetil içeriği azaltılmış bir ürün olan kitosanı elde etmiştir. 1934 yılında kitosandan film üretimi ve lif eldesi konusunda olmak üzere iki patent alınmıştır. Aynı yıl, Clark ve Smith tarafından çok iyi oryante olmuş kitosan lifi üretimi de başarı ile gerçekleştirilmiştir (Demir ve Seventekin 2009).

1.6.1. Kitinden kimyasal yolla kitosan eldesi

Şekil 1.13'de görüldüğü gibi kabuklu artıklarından kitinin izolasyonu üç basamaktan oluşmaktadır (Shahidi *et al.* 1999; Bostan *et al.* 2007).

1. **Protein ayrımı:** Deproteinizasyon
2. **Kalsiyum karbonat (ve kalsiyum fosfat) ayrımı:** Demineralizasyon
3. **Renk ayrımı:** Dekolorasyon

Bu işlemlerde kitinin protein, mineral ve pigmentlerden uzaklaştırılarak, kimyasal yollarla, farklı deasetilasyon derecelerinde saf olarak elde etmek amaçlanmaktadır. Şekil 1.15'da görüldüğü gibi kitinin deasetilasyonu sonucu ise başlıca türevi olan kitosan elde edilmektedir (İmamoğlu 2011).



Şekil 1.15. Kitinin deasetilasyonu ile kitosan eldesi (İmamoğlu 2011)

Kitin ve kitosanın en büyük avantajı yenilenebilir bir kaynak ve çevre dostu doğal bir biyopolimer olmasıdır. Bu özellikleri ile son yıllarda birçok farklı sektörde kullanım alanı bulmuştur (Synowiecki and Al-Khatteb 2003; Shahidi and Abuzaytoun 2005; İmamoğlu 2011).

1.7. Kitin, Kitosan ve Türevlerinin Kullanım Alanları

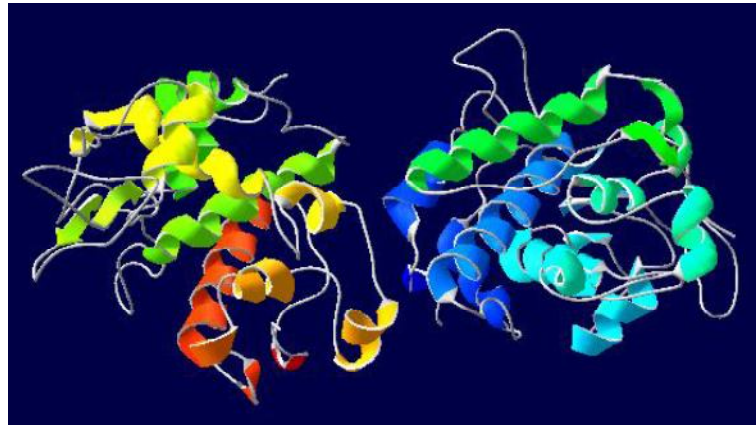
Çizelge 1.2. Kitin, kitosan ve türevlerinin kullanım alanları (Demir ve Seventekin 2009)

Uygulama Alanları	Kullanımları
Gıda	Doğal kıvamlaştırıcı Gıda koruyucu Hayvan yemlerini de içeren yiyecek katkı maddesi Gıda işlemede (örneğin şeker işleme) Filtreleme ve temizleme Hipokolestrolemik madde (zayıflama maddesi) Atık yiyeceklerin tekrar işlenmesi
Ziraat	Bitki katkı maddesi Antimikrobiyal ve antifungal madde Bitki tohumu kaplanması Gübre yapımı İnsektisid ve nematositlerde
Medikal Alan	Hayvan ve insanlar için yara bandı yapımında Sargı bezi yapımında ve yara tedavisinde (yara tedavisini %30 oranında hızlandırmaktadır.) Yanık tedavisinde acıyı dindirme ve iyileştirme etkisi Kanı pıhtılaştırıcı madde Hidrojel yapımı Antikoagülant ve antitrombojenik materyaller (sülfatlanmış-kitin türevleri olarak) Hemostatik madde Kontakt lens yapımı İlaç salımı
Kozmetik	Saç şekillendirici yapımı Cilt nemlendirmede (nemlendirici kremlerde) Antikolestrol ve yağ bağlayıcı olarak zayıflama maddesi Aftershave, deodorantlarda koku giderici madde
Biyoteknoloji	Kromatografik yöntemlerde Enzim immobilizasyonunda
Su arıtımı	Kirlenmiş atık sular için koagülasyon ve flokülasyon Atık sudaki metal iyonlarının uzaklaştırılması ve geri kazanımı

Kitin ve türevleri Çizelge 1.2’de görüldüğü gibi birçok alanda kullanım alanı bulmuştur. Ancak doğada selülozdan sonra ikinci en yaygın biyopolimer olan kitin birçok alanda yaygın biçimde kullanılmasına karşın sıkı moleküler üstü yapısı nedeniyle bazı durumlarda sorunlarla karşılaşılabilir. Bu nedenle kitin yerine, deasetilasyonu sonucu elde edilen ve başlıca türevi olan kitosan kullanılmaya başlanmıştır. Kitosan, başta medikal alanda olmak üzere ziraatten gıdaya, tıptan kozmetiğe kadar birçok alanda kullanım alanı bulmuştur (Demir ve Seventekin 2009).

1.8. Kitinaz Enzimi

Kitinin hidrolizlenmesinde, iki tip enzimden ilk büyük enzim olan kitinazlar [poli- β -1,4-(2-asetamid-2-deoksi)-D-glukozit glikanohidrolaz, EC 3.2.1.14] rol oynamaktadır. Kitinazlar endokitinazlar ve ekzokitinazlar olarak iki alt gruba ayrılır. Endokitinazlar N-asetilglukozaminin multimerlerini oluştururken, ekzokitinazlar ise polimerin indirgenmemiş ucundan başlayan, düşük moleküler ağırlığa sahip, çözünebilen dimerlerin sürekli salınmasını katalizler. İkinci tip enzim olan kitobiazlar ise kitobiozu N-asetilglukozamin monomerine hidroliz eder (Suginta *et al.* 2005).



Şekil 1.16. Kitinaz enziminin 3 boyutlu yapısı (Kuzu 2008)

Endokitinazlar kitin polimerini içten parçalayarak ekzokitinazlar da kitobiozu bir uçtan salıvererek işlev görürler. Beta-N-asetil glikozaminidaz N-asetil glikoz amin monomerlerini kitinden çıkarır bu durumda kitobiaz da kitobiozu N-asetil glikozamine hidroliz eder (Kuzu 2008).

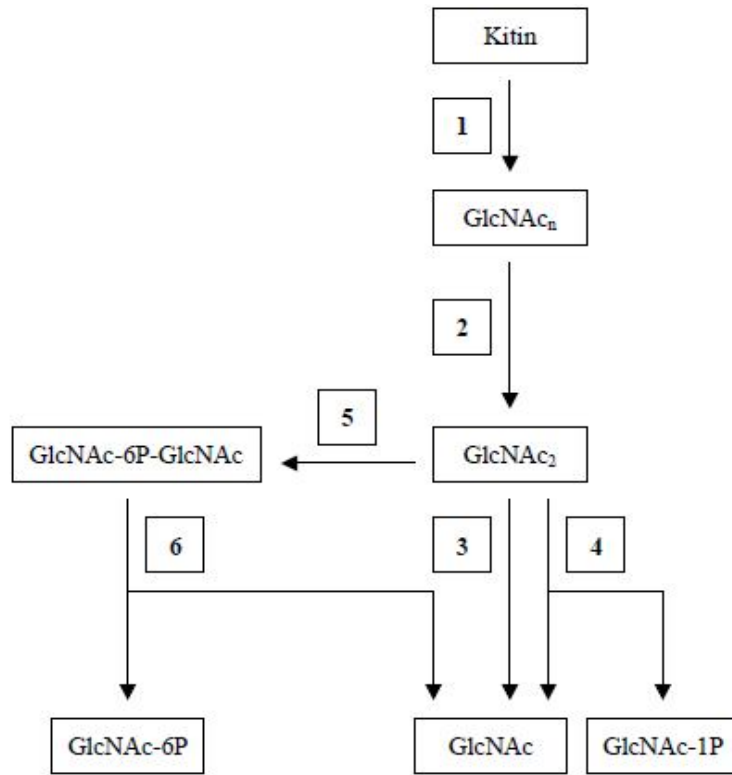
Bakterilerde kitinazlar, mantar, protozoa ve omurgasızlara karşı parazitlikte rol oynarlar. Aynı zamanda morfogenezin de kapsamındadırlar. Kitinazlar, bitki ve omurgalıların savunma mekanizmalarında da görevlidirler. Böcek zararlılarının biyolojik kontrolünde kullanılan baculoviruslar patojenik etki için kitinaz üretirler (Gooday 1995; Çağlar 2005). Bitkiler, kitinazı fungal patojenlere karşı kendilerini korumak için üretirler (Wen *et al.* 2002). Kitinaz, fungal patojenlerin misellerini parçalar. Doğal olarak genotipinde kitinaz geni bulunduran bazı bitkiler bilinmektedir. Örneğin akçaağaç, siyah, kırmızı ve beyaz meşe ağaçlarının sağlıklı gövde ve kök dokularında β -1,3-glukanaz ve kitinaz varlığı tespit edilmiş ve bu enzimlerin bu ağaçlarda patojen olan *Armillaria mellea*'nin hif çeperlerinin erimesine sebep olduğu bildirilmiştir (Muzzarelli 1977; Yakupoğlu 2009).

Bakterilerin ürettiği kitinaz enzimi bir dizi kimyasal işlemle sonra kitini glikoz ve amonyak haline dönüştür. Kitinazlar yüksek organizasyonlu bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Bu enzim; domates, soya fasulyesi, buğday kepeği gibi bitkilerden izole edilmiştir ve *Streptomyces* (özellikle *S. griseus*) *Serratia* ve *Aeromonas* türleri potansiyel üreticileridir (Dubourdieu *et al.* 1985).

1.8.1. Kitinin enzimatik hidrolizi

Biraz önce de bahsedildiği gibi birçok bitki, böcek ve mikroorganizma kitinin enzimatik hidrolizinden sorumlu kitinaz enzim sistemine sahiptir. Kitinin enzimatik hidrolizi Şekil 1.17'de gösterilmiştir. Kitinin enzimatik hidrolizinin ilk aşamasında endo ve ekzokitinazların kombinasyonu ile glukozamin dimerlerine (GlcNAc₂) parçalanır (reaksiyon 1 ve 2). Daha sonra β -N-Asetilglukozaminidaz (GlcNAcase; reaksiyon 3) GlcNAc

dimerlerini hidrolizler veya kitooligosakkaridlerden GlcNAc'lerin salınımını gerçekleştirir (Gooday 1994). Bazı organizmalar GlcNAc₂ ünitelerini GlcNAc₂ fosforilaz enzimi ile GlcNAc ve GlcNAc-1-fosfata parçalar (reaksiyon 4), (Park *et al.* 2000) veya bir GlcNAc₂ fosfotransferaz sistemi ile dimeri GlcNAc-6-fosfat-GlcNAc yapısına dönüştürür (reaksiyon 5). Bu yapı 6-fosfo-β-glukozaminidaz ile GlcNAc ve GlcNAc-6-fosfata parçalanır (reaksiyon 6), (Keyhani and Roseman 1997; Keyhani *et al.* 2000; Çağlar 2005).



Şekil 1.17. Kitinin enzimatik hidrolizi (Tanaka *et al.* 2003; Çağlar 2005)

1.8.2. Kitinaz enziminin kullanım alanları

Kitinazlar özellikle bitkilerdeki patojenik mantarlara karşı biyokontrolde, kitin oligosakkaritlerinin ve tek hücre proteini üretimi gibi birçok endüstri ve tarım alanındaki uygulamalarda kullanılırlar (Shaikh and Deshpande 1993; Patil *et al.* 2000).

Kitinaz enzimi her sene pek çok deniz canlısının evi ve sığınağı olan kabukların, içindeki canlıların ölmesi sonucu, okyanus ve deniz diplerinde kirliliği kitin parçalayıcı organizmalar sayesinde engellemektedir. Özellikle *Vibrio furnisii* olarak isimlendirilen bakteriler deniz ve okyanuslarda en önemli kitin parçalayıcı bakteriler olarak görev yapmakta ve bu bakterilerin ürettiği kitinaz bir dizi kimyasal işlemde sonra kitini glikoz ve amonyak haline dönüştürmektedir (Kuzu 2008).

Patojenik küf mantarlarının hücre duvarının kitin içermesi sebebiyle kitinaz enzimi biyokontrolde oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Kitinaz üreten mikroorganizmaların biyokontrolde kullanılmaları ya direkt olarak bitki ile bulaştırılmalarını ya da kitinaz enzimini kodlayan genlerinin bitkilere transgen olarak uygulanması ile gerçekleştirilir (Chet 1993; Harman and Kubicek 1998; Lorito *et al.* 1998; Harman 2000).

Kitinaz enzimi sayesinde kitooligosakkaritler üretilmektedir. Kitooligosakkaritler bitki savunmasında ortaya çıkan maddelerdir ve tıpta önemli bir kullanım alanları vardır. Örneğin; kitoheksoz ve kitoheptoz anti-tümör etkisi gösterir. *Vibrio alginolyticus*'tan elde edilen kitinaz koloidal kitinden kitopentoz ve kitotrioz meydana getirir (Muraio *et al.* 1992; Çağlar 2005).

1.9. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada çevreden izole edilen mikroorganizmaların patojen fungus olarak sebzelerde kök çürüklüğüne neden olan ve hıyardan izole edilen *Fusarium culmorum*'a karşı antifungal aktivitesinin belirlenerek, en yüksek kitinaz üretme yeteneğinde olan suşlardan üretilen kitinaz enziminin karakterizasyonu amaçlanmıştır. Enzim karakterizasyonu için; kısmi saflaştırma, optimum pH ve optimum sıcaklık tayinleri gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

McClery *et al.* (1987), fermentasyon yoluyla *Bacillus pumilis*'ten ticari kitosanazlar (Chitosanase BP [MJ]) üretmişlerdir. Enzimin, glükozamin polimerlerini içeren mikroorganizmaların duvarını parçalayabildiğini belirtmişlerdir. Enzim için optimum pH ve sıcaklık aralığı sırasıyla 5-6,5 ve 40-60 °C olarak tespit edilmiştir.

Perrakis *et al.* (1994), tütünde yeni bir tip kitinazı, çinko affinite kolonu kullanarak saflaştırılmışlar ve daha sonra klonlamışlardır.

Bhushan ve Hoondal (1999), *Bacillus sp.* BG-11'den saflaştırılmış termostabil kitinaz enzimi, Aromex, Captafol, Captan, Chlorothalonil, Dinocap, Metalaxyl, Sulphur, Triadimefon, gibi fungusit, Acephate, Chloropyriphos, Cypermethrin, Diclovorus, Dimethoate, Methomyl, Malathion, Methylparathion ve Monocrotophos gibi insektisit varlığında, litrede 100 µg enzim konsantrasyonunda aktivitesinin %90'nını koruduğunu, ancak Allosamidin kitinazı IC₅₀ ve 48 µM'da inhibe ettiğini saptamışlardır.

Wiwat *et al.* (1999), *Bacillus circulans* No.4.1 suşunun kitinaz ürettiğini bu kitinazın geniş pH aralığında (6,0- 12,0) kitini hidroliz ettiğini, eğer kitinaz kodlayan gen *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*'ye aktarılırsa böceklerle biyolojik savaşta ciddi toksisite artışına sebep olacağını bildirmişlerdir.

Nielsen *et al.* (1999), *Pythium ultimum* ve *Rhizoctonia solani*'e karşı antagonistik olarak şeker pancarı ve arpanın rizosferinden izole edilen *Pseudomonas fluorescens*'in 12 izolatu, dış kaynaklı kitin olmayan ortamda geliştiğinde kesikli kültürde kitinolitik aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Zhang *et al.* (2000), *Bipolaris sorokiniana*'nın biyokontrol ajanı *Stenotrophomonas maltophilia* C3 suşu ile kitin içeren sıvı ortamda kitinaz üretmişlerdir. Kitinaz, amonyum sülfat çöktürmesi ve kitin afinite kromatografisi ile sıvı kültürden kısmı saflaştırılmıştır. Kitinaz aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 4,5-5,0 ve 45-50°C olarak belirlenmiştir. Kitinaz aktivitesi Hg^{2+} ve Fe^{3+} ile inhibe edilmişken, diğer metal iyonları ve enzim inhibitörleri ile inhibe edilememiştir. Sonuç olarak C3 suşunun, en az iki antifungal etkinlik gösteren kitinaz enzimi ürettiği belirlenmiştir.

Sindhu and Dadarwal (2001), yeşil fasülye (*Vigna radiata* L.) ve nohutun (*Cicer arietinum* L.) rizosferinden izole edilen *Pseudomonas* suşları, selüloz ve kitinaz üretimi için taranmıştır. Beş *Pseudomonas* suşunda, potato dextrose agar ortamının bulunduğu petri kutularında iki mantar olan *Pythium aphanidermatum* (Oomycete) ve *Rhizoctonia solani* (Basidiomycete)'nin gelişimini engellediği gösterilmiş ve kültürden bağımsız üst fazda her iki enziminde kayda değer miktarda üretildiği bulunmuştur.

Kim *et al.* (2002); kitinaz enzimini, *Streptomyces sp.* M-20 kültür filtratından izole ederek ve amonyum sülfat çökeleğinden DEAE-selüloz iyon değiştirici kromatografi ve Sephadex G-100 jel filtrasyonu ile saflaştırmışlardır. Çalışmalarında saflaştırdıkları kitinaz enziminin, *Botrytis cinerea*'a karşı antifungal aktivite gösterdiğini ve bu fungusun hücre duvarında lizozimal etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

San-Lang *et al.* (2002), topraktan iki *Bacillus subtilis* suşu izole etmişlerdir. Deniz atıklarının kitinini içeren ortamda aerobik olarak büyüyen bu suşların, kültür ortamından elde edilen ham fungusitler, patojenik mantar *Fusarium oxysporum* üzerinde antifungal aktivite göstermiştir. *B. subtilis* W113 ve *B. subtilis* W118 suşları, büyüme ortamına sırasıyla %1,75 ve %0,75 kitin eklendiğinde maksimum antifungal aktivite göstermiştir. Bu iki suş tarafından üretilen ham fungusitlerin inhibitör etkileri, pH değişimi ile önemli ölçüde etkilenmemiştir. Bu ham fungusitlerin önemli ölçüde termostabil olduğu ve inhibitör aktivitelerinin, 100°C'de 30 dakika ısıl işleme tabi tutulduğunda dahi bir kısmının korunduğu belirtilmiştir. Ayrıca, deniz atıklarındaki kitinin kullanımı, *B. subtilis* ile kitinolitik enzim üretimi ilk kez belirlenmiştir.

Vaidya *et al.* (2003), *Alcaligenes xylosoxydans*'tan kitinaz enzimi elde etmişler ve SDS-PAGE ve gel filtrasyon tekniği ile enzimin moleküler ağırlığını yaklaşık 44-45 kDa olarak saptamışlardır. Enzim, 50°C'de ve pH 5'te optimum aktivite göstermiştir. 5mM Cu^{+2} ve Na^+ kitinaz aktivitesini %25 inhibe ederken, aynı konsantrasyonlarda Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Ba^{+2} etki etmemiştir. Ayrıca saflaştırılan enzimin, *Aspergillus niger* misellerini parçaladığı saptanmıştır.

Ramirez *et al.* (2003), Remazol Brilliant Blue R® ile boyanmış koloidal kitinin kullanımına bağlı, kitinaz aktivitesini artırmayı amaçlayan basit ve duyarlı bir metod kullanmışlardır. Bu teknikte, işaretlenmiş koloidal kitin, sıvı besiyerinde bulunduğu takdirde, kitinolitik mikroorganizmaların seleksiyonunu ve karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Orantılı olarak çözünmüş substrat, boyayı serbest bırakmış ve 595 nm'ye ayarlanan spektrofotometrede ölçülmüştür. Bu çalışmada, boyanmış koloidal kitin ile ticari chitin-azure substratları kıyaslanmıştır. Boyanmış substratlarda *Bacillus thuringiensis* BT-107 suşundaki kitinaz aktivitesine pH, substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve zamanın etkisi incelenmiştir.

Radjacommare *et al.* (2004), bitki büyümesini teşvik edici kitinaz üreten bakteri suşları ile bitkilere muamele edilmiş ve bitkilerin zararlı bir mantar olan *R. solani* ile enfeksiyondan korunduklarını gözlemişlerdir. Çalışmada kitinaz negatif olarak kullanılan suşun fungal patojene karşı herhangi bir koruma kapasitesi olmadığı belirlenmiş ve fungal patojene karşı aktif elementin kitinaz olduğu net bir şekilde anlaşılmıştır. Böylece aktivitesi ve moleküler özellikleri amaca uygun olan bir *kitinaz* geni bitki büyümesini teşvik eden bakterilere klonlanarak bitki gelişim ve korunması sağlanmıştır.

Yuli *et al.* (2004), Endonezya'nın Tompaso sıcak su kaynağından kitinaz üreten bir bakteri izole etmiş ve bu bakteriyi sekans analizine göre *Bacillus sp.* 13.26 olarak tanılamışlardır. Bu bakteri, %5'lik kitin içeren besiyerinde 55°C'de 72 saatlik inkübasyon sonunda ekstrasellüler kitinaz üretmiştir. Enzimi, NH_4SO_4 (amonyum sülfat) yöntemi ile saflaştırmışlar ve saf enzim moleküler ağırlığı SDS-PAGE'de 60

kDa olarak saptanmıştır. Enzim, 60°C sıcaklık ve pH 7.8'de optimum aktivite göstermiştir. 70°C sıcaklıkta 5 saat ön inkübasyon sonucunda kitinaz aktivitesi korunmuş ve zimogram analizleri ile de enzimin termal stabilitesi doğrulanmıştır. 80°C sıcaklıkta 1 saatlik inkübasyondan sonra enzim aktivitesinin önemli derecede korunduğu belirlenmiştir.

Wang *et al.* (2005), *Pseudomonas fluorescens* K-188 fungal fitopatojenleri (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Trichoderma harzianum* ve *Pythium ultimum*) inhibe eden antifungal maddeler ürettiği belirlenmiştir. Antifungal maddelerin konsantrasyonunda, etanol çökeltisi amonyum sülfat çökeltisinden daha iyi olduğu bulunmuştur. 10 dakika 100 °C'de sıcaklık uygulaması sonrasında dahi orijinal antifungal aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Mikroskopik incelemede, antifungal maddeler ilave edildiği zaman *F. oxysporum*'un hifini inceltmeye başladığı ve sporlarının çimlenmesini engellediği görülmüştür. *P. Fluorescens* K-188'in antifungal aktivitesi öncelikle, hücrelerin kendileri ve 11 kDa moleküler ağırlığına sahip bir antifungal protein ile ilişkilendirilmesi gerektiği rapor edilmiştir.

Çağlar (2005), bitki biyokontrolünde sıkça kullanılan bir küf mantarı olan *Trichoderma atroviride*'nin ürettiği kitinaz enzimi incelemiştir. Patates-dekstrozu agar üzerinde yetiştirilen *T. atroviride*'den kitinaz indüksiyonu, *T. atroviride*'nin yer değiştirme yöntemi kullanılarak, %0.1 kolloidal kitin içeren sıvı besiyerinde, 30 °C'de 48 saat boyunca çalkalamalı inkübasyon sonunda enzim içeren sıvı besiyerindeki *T. atroviride* miselleri süzölmüş, süzöntü 5000 devir/dakika'da 30 dakika santrifüj edilerek çökelti ve üst sıvı ayrılmıştır. Santrifüj işlemi sonunda çökelti atılmış ve üst sıvı ham filtrat olarak adlandırılıp, çöktürme işleminin uygulanacağı ham filtratta enzim aktivitesi ve protein miktarı tayini yapılmıştır. Spesifik kitinaz aktivitesi 2,339 U/mg olarak bulunmuş ve çalışmanın devamında kitinaz enzimine amonyum sülfat tuzu, etanol, aseton ve trikloroasetik asit gibi farklı çöktürme yöntemlerinin etkisi de incelenmiştir.

Okay (2005), kitinaz A enzimini kodlayan geni (*chiA*) Trabzon ili çevresinden izole edilmiş olan *Serratia marcescens* Bn10'dan PCR yoluyla çoğaltılmış ve klonlayarak *E. coli/Bacillus* vektörlerine (pNW33N ve pHT315) yerleştirmiştir. Klonlanan *chiA* geninin nükleotid dizisi analiz edilmiştir. Dizi GenBankası'na sunulmuş ve DQ165083 numarasını almıştır. Yerli izolat *S. marcescens* Bn10 tarafından farklı kültür koşullarında kitinaz üretimi incelenmiştir. Kitinaz üretimi için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 30°C ve 7,5 olarak bulunmuştur. Kolloidal kitinin farklı konsantrasyonlarının ve besiyerine eklenen NAG'nin kitinaz üretimine belirgin bir etkisi saptanmamıştır. Daha sonra sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu ve elementlerin inhibisyonu gibi farklı parametrelerin enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. *S. marcescens* Bn10'a ait kitinaz pH 4,0–9,0 aralığında 45°C'de en yüksek aktivite göstermiştir. Kitinaz aktivitesi 35 mg/mL'ye kadar artan substrat konsantrasyonlarına bağlı olarak arttığı bulunmuştur. Çalışmanın devamında, Ca⁺², Co⁺², Cu⁺², EDTA, Fe⁺², Mg⁺², Mn⁺² ve Zn⁺²'nin enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. 10 mM EDTA'nın enzimi %4 oranında inhibe ettiği, 10 mM Co⁺²'nin ise aktiviteyi %20 oranında artırdığı bulunmuştur.

Chang *et al.* (2007), *Bacillus cereus*'un bitki büyümesini stimüle edici bileşiklerin, deniz atıklarından kitinin kullanılmasıyla elde edildiğini bildirmişlerdir.

Kuzu (2008), çalışmasında kitinaz üreticisi *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 suşu kitin içeren doğal ortamdan izole edilmiş, biyokimyasal ve morfolojik özelliklerin yanı sıra yağ asidi ve 16S RNA dizi analizlerine göre tanılamıştır. *B. thuringiensis* HBK-51 suşunun kültür süpernatantından elde ettiği kitinaz, geniş pH (3.0-11.0) ve sıcaklık (30-120 °C) aralığında aktivite göstermiştir. Optimum aktivite pH 9,0 ve 110 °C'de gözlenmiştir. Enzim, 3 saatlik ön inkübasyondan sonra; pH 9,0-12,0 aralığında (%98 kalan aktivite) ve 110 °C'de (%96 kalan aktivite) yüksek düzeyde aktivite göstermiştir. Bu özellikleri dikkate alındığında; hipertermofil-termostabil ve alkali olarak tanımlamıştır. %12'lik SDS-PAGE analizi ile 50 ve 125 kDa boyutlarında enzimin 2 izoformu saptanmış ve NiCl₂ (%32), KCl (%44) ve CuCl₂ (%56) gibi metal iyonları aktivite artışına, EDTA (%7), SDS (%7), HgCl₂ (%11) ve Etil-Asetimidat (%20) aktivite azalmasına neden olduğu bulunmuştur.

Yakupoğlu (2009), çalışmasında, doğal olarak ölmüş *Helicoverpa armigera* larvasından *Serratia marcescens* bakterisi izole edilmiş ve bu bakteriden kitinaz A, B ve C enzimlerini kodlayan genler (*chiA*, *chiB* ve *chiC*) dejenerat primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan genlerin nükleotid dizilimini belirlemek için PCR rnleri pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlanıp, dizin analizine gönderilmiştir. Dizin analizi yapılan *kitinaz* A, B ve C genlerinin DNA ve aminoasit sıraları literatürdeki mevcut *kitinaz* genlerinin DNA ve aminoasit sıraları ile karşılaştırılıp, analiz sonuçları çalışmada izole edilmiş *S. marcescens* bakterisine ait *chiA* geninin literatürde ki *S. marcescens* (BJL200) *chiA* genine %99, *chiB*'nin literatürde ki *S.marcescens* (BJL200) *chiB* genine %97 ve *chiC*'nin ise literatürde ki *S. marcescens chiC1* genine %96 oranında benzer olduğunu göstermiştir. Dizin analizi yapılan bu *kitinaz* genleri pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak *Escherichia coli*'de proteinleri ekspres edilip, ekspres edilen proteinler saflaştırılarak, SDS-PAGE analizine tabi tutulmuştur. Bu analiz sonucunda *chiA* genine ait 57 kDa'lık, *chiB* genine ait 53kDa'luk ve *chiC* genine ait 50kDa'luk protein bantları jel üzerinde belirlenmiş ve elde edilen enzimlerin en iyi çalıştığı pH ve sıcaklık aralıklarına bakılmıştır. Buna göre; kitinaz B'nin en iyi pH 9 ve 35°C sıcaklıkta, kitinaz C'nin ise pH 8,5 ve 33°C sıcaklıkta aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Chang *et al.* (2010), ucuz kitinolitik enzimlerin üretiminde kabuklu artıkların işlenmesinin önemli bir unsur olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada antifungal kitinaz üreten bakterilerin izolasyonu için substrat olarak kullanılmak üzere, yengeç ve karidesin işlenmesi sonrasında ortaya çıkan atıkları kaynatıp ezerek yengeç ve karides kabuğu tozu elde etmişlerdir. Topraktan izole edilen *Bacillus subtilis* NPU 001 suşu, kitinaz için ana karbon kaynaklarından olan karides ve yengeç kabuğu tozunun %2'sini ihtiva eden ortamda geliştirmişlerdir. Sıralı kromatografi ile saflaştırılan kitinazın (2 mg ml-1), *Fusarium oxysporum*'un hif uzantısını inhibe ettiği bulunmuştur. Diğer bilinen bakteriyel kitinazlar ile karşılaştırıldığında 001 NPU'nun kitinazının, kolloidal kitinin enzimatik hidrolizi ile oluşan kitotriose'nin üretimi ve mantar bitki patojenlerine karşı antifungal aktivite içermesi gibi kendine özgü özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir.

Ghasemi *et al.* (2011), İran'da yüksek tuzluluğa sahip ortamdan izole ettikleri *Bacillus pumilus* SG2 bakterisinin, iki kitinaz enzimini (ChiS ve ChiL) ürettiği belirlemiştir. Çalışmada, chiS ve chiL genleri pQE-30 expression vektöründe klonlanmış ve *Escherichia coli* M15 suşunun stoplazmasına eksprese edilmiştir. Ni-NTA kolonu kullanılarak rekombinant proteinler saflaştırılmıştır. Enzim aktivitelerinin optimum sıcaklık ve pH değerleri, ChiS için 50°C ve pH 6, ChiL için ise 40°C ve pH 6,5 olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan kitinaz enzimlerinin *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma reesei*, *Botrytis cinerea* and *Bipolaris sp.*'e katışı anti-fungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, saflaştırılan ChiS, mantar hücre duvarındaki kitin bileşenlerini ve hücre duvarının peptidoglukan bileşenini birçok bakteri (*Xanthomonas translucens pv. hordei*, *Xanthomonas axonopodis pv. citri*, *Bacillus licheniformis*, *E. coli* C600, *E. coli* TOP10, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*) ile azaltabilme yeteneğine sahip olduğundan kitinaz/lizozim olarak tanımlanmıştır. Öte yandan, ChiS ve *Bacillus circulans* WL-12 suşundaki kitinaz/lizozim'in üç boyutlu yapıları arasında güçlü benzerlikler bulunduğunu ortaya koymuş ve B. pumilus'dan kitinaz/lizozim çift fonksiyonunu ilk kez rapor etmişlerdir.

Yan *et al.* (2011), çalışmalarında yaptıkları tohum çimleme ve domates fide testlerinde, *Bacillus subtilis* SL-13 suşunun domatesin büyümesini ve çimlenmesini hızlandırmış olabileceğini göstermiştir. Domates fidelerinin taze ve kuru ağırlıklarının sırasıyla %42,86 ve %18,75 oranında arttığı belirlenmiştir. SL-13'ün domates de *Rhizoctonia* çürüklüğünün kontrolündeki etkinliği tarla ve serada sırasıyla %20,65 ve %35,23 olduğu belirlenmiştir. Bitki patojeni *Rhizoctonia solani* mantarının büyümesi, kültür süpernatantın da SL-13 varlığında önemli ölçüde inhibe edilmiştir. Yapay ortamda, başlıca antifungal proteinin kitinaz olduğu tespit edilmiştir. Kitinaz aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 7,0 ve 50°C olarak belirlenmiştir. Enzimin pH 5-9 ve sıcaklığın 40-60°C aralıklarında stabil olduğu görülmüştür. 20 dakika için 0.11 MPa basınç ve 121°C'de inkübe edildiğinde enzim aktivitesinin %70'nin korunduğu, ayrıca enzimin proteaz K ve ultraviyole radyasyona duyarlı olmadığı görülmüştür. Bu

durumun, kısmen stabil olmayan çevrede biyolojik kontrol etkisi için uygun olduğu belirtilmiştir.

Chandrasekaran *et al.* (2012), çalışmalarında *Bacillus subtilis*'tan hücre dışı kitinaz saflaştırmışlardır. Öldürücü konsantrasyon (LC50), *Spodoptera litura* Fab'ın birinci, ikinci ve üçüncü larva dönemlerinde kitinaz kullanılarak belirlenmiştir. Kitinazın 48 saat içerisinde 6 IM konsantrasyonda en yüksek insektisidal aktivite gösterdiği bulunmuştur. 6 IM konsantrasyonda ($P < 0,05$) besinsel endekslerinin de önemli ölçüde etkilendiği saptanmıştır. Çalışmalarında, kitinaz ile konakçı bitki yapraklarındaki artan ölüm oranı, larval büyüme ve ağırlık gibi tehlikelerin azaltılabileceği gösterilmiştir.

Kumaran *et al.* (2012), yengeç ve karides kabuğundan izole ettikleri aktinobakterial suşların koloidal kitin agar besiyerinde kitinolitik aktivitesini araştırmışlardır. İnkübasyon sonrasında suşların oluşturduğu şeffaf zonlar kitinaz üretimi için seçilerek her iki günde bir kitinolitik aktivite ölçülmüş ve ham ekstraktın antibakteriyel aktivitesi, disk difüzyon metoduyla test edilmiştir. Çalışmada, CDB20 suşunda beklenen şeffaf zon çapının oluşumu gözlenmiş ve 10 gün için kitin ortamı içine inoküle edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kitinaz aktivitesi 1,22 U/ml olarak ölçülmüştür. İlk taramada klinik bakteri patojenlerine karşı antibakteriyel aktivite göstermiş, ikinci tarama sonucunda ise maksimum *K. pneumonia*'ya (23 mm) ve minimum *S. aureus*'a (18 mm) karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Çalışmadaki bu etkili suşun *streptomyces* cinsine ait olduğu tanılanmıştır.

Ma *et al.* (2012), *Gliocladium catenulatum*'dan izole ettikleri ve saflaştırdıkları kitinaz enziminin aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 6,0 ve 60°C olarak belirlemişlerdir. Enzim aktivitesi pH 4-5 ve sıcaklık 20-40°C aralığında stabil olduğu bulunmuştur. Ayrıca Co^{2+} ve Ca^{2+} enzimin aktivitesini arttırırken Fe^{3+} , Cu^{2+} , ve Ag^{+} metal iyonlarının aktiviteyi inhibe ettiği saptanmıştır. Kitinazın çeşitli patojenik bitki mantarlarının çimlenmesini ve hifal büyümesini engellediği bulunmuştur.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri izolatları

Kullanılan bakteri türleri ve bu türlere ait toplam izolat sayıları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Çalışmada toplam 158 bakteri izolatı kullanılmıştır. Bu izolatlar; *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas flourescens*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus thuringiensis*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus polymyxa* ve *Pantoea agglomerans* türlerine dahildir. Bu bakteriler; Doç. Dr. Recep Kotan (Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü) tarafından daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda, biyolojik mücadele ve bitki büyüme ajanı özelliğine sahip 7 bine yakın bakteri, ülkemizdeki çeşitli kültür ve yabani bitkilerin toprak üstü aksamı veya kök rizosferinden izole edilmiştir. İzole edilen bu bakteriler klasik sistemler ve moleküler sistemlerden yağ asidi metil esterlerine göre tanı yapan MIS sistemi kullanılarak tanılanmıştır. Tütünde yapılan aşırı duyarlılık test sonuçlarında bu bakteri izolatlarının negatif sonuçları verdiği belirlenerek bitki patojeni olmadıkları teyit edilmiştir. Bu bakteriyel izolatların pek çoğunun, çeşitli bitki patojeni bakteri ve fungusu karşı biyoajan özelliklerinden dolayı hastalıkları kontrol edebildikleri, azot fiksasyonu, fosfatı çözebilme, siderofor, hormon, amino asit ve organik asit üretimlerinden dolayı çeşitli bitkilerde bitki büyüme ajanı olarak verim ve kalitede artışlara sebep oldukları tespit edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri türleri ve bu türlere ait toplam izolat sayıları

Çalışmada kullanılan bakteri türleri	Test edilen toplam izolat sayıları
<i>Bacillus megaterium</i>	46
<i>Bacillus subtilis</i>	21
<i>Bacillus pumilus</i>	19
<i>Pseudomonas flourescens</i>	15
<i>Pseudomonas putida</i>	15
<i>Bacillus thuringiensis</i>	11
<i>Paenibacillus macerans</i>	11
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	10
<i>Pantoea agglomerans</i>	10
Kullanılan toplam izolat sayısı	158

3.1.2. Çalışmada kullanılan patojen fungus izolatı

Çalışmada patojen fungus olarak sebzelerde kök çürüklüğüne neden olan ve hiyardan izole edilen *Fusarium culmorum* Ant-17 izolatı kullanılmıştır. Bu fungus izolatı Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü mikroorganizma kültür koleksiyonundan temin edilmiş olup bu izolatın virülanslığının oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Fusarium culmorum* Ant-17 izolatının patojenite testinden bir görünüm

Test bitkisi olarak hıyar (*Cucumis sativus* L. Anamas Tohum firmasına ait Kros F1 isimli ticari çeşidi kullanılmıştır. Patojen fungus inokulasyonunda ise buğday kepeği kullanılmıştır.

3.1.3. Enzim aktivitesi için kullanılan çözeltiler

3.1.3.a. Substratın hazırlanışı

Substrat 0,02 M Sodyum sitrat çözeltisine %0,05'lik kitin ilave edilerek hazırlanmıştır. Çözelti içerisinde yer alan 0,02 M Sodyum sitrat tamponu ise; 5,88 g Sodyum sitrat tartılıp, distile su ile 100 mL'ye tamamlandıktan sonra pH 6,0'a ayarlanarak hazırlanmıştır.

3.1.3.b. Renklendirme çözeltisinin hazırlanışı

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

3.1.4. Optimum pH aktivitesi için kullanılan tamponlar

3.1.4.a. Sodyum asetat tamponu

Kitinazın pH 2,0-3,0 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla 0,1 M asetat tamponu kullanılmıştır. 0,1 M asetat tamponu için 0,82 g sodyum asetat tartılmış ve 100 ml distile su ile tamamlanmıştır. Uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl kullanılmıştır.

3.1.4.b. Sodyum sitrat tamponu

Kitinazın pH 4,0-6,0 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla 0,1 M sodyum sitrat tamponu kullanılmıştır. 2,8 g sodyum sitrat tartılmış ve 100 ml distile su ile tamamlanmıştır. Uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0,1 M'lık HCl kullanılmıştır.

3.1.4.c. Tris hidroklorik asit (Tris-HCl) tampon çözeltisi

Kitinazın pH 7,0-9,0 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla 0,1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılmıştır. 0,121 g Trizma base 100 ml suda çözünerek hazırlanmış ve uygun pH değerini elde etmek üzere 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl kullanılmıştır.

3.1.4.d. Sodyum karbonat tamponu

Kitinazın pH 10,0-11,0 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla sodyum karbonat tamponu kullanılmıştır. 0,105 g sodyum karbonat tartılmış ve 100 ml distile su ile üzeri tamamlanmıştır. Uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmada kullanılan bakteri ve fungus kültürlerinin muhafazası

Her bakterinin 24 saatlik saf kültüründen bir öze dolusu alınarak, içerisinde 500 µl %30'luk gliserol ve 500 µl LB Broth (1 L dH₂O'ya 10 g tryptone, 10 g NaCl ve 5 g yeast extract ilave edilerek hazırlanmıştır) bulunan eppendorf tüplere aktarılarak etiketlenmiş ve karıştırıcıda karıştırılarak daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir. Patojen fungus ise yatık agarda hazırlanan PDA besi

ortamında geliştirilerek buzdolabında daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2.2. Bakteri izolatlarının petride antifungal aktivitelerinin belirlenmesi

Çizelge 3.1’de verilen toplam 158 bakteri izolatının patojen fungus *Fusarium culmorum*’a karşı antifungal özelliklerinin belirlenmesi için Potato Dextrose Agar (PDA-Oxoid) besi yeri içeren Petriler kullanılmıştır. Bunun için patojen fungus PDA besi ortamında 24°C’de 15 saat aydınlık 9 saat karanlık şartlarda geliştirilmiştir. Potansiyel biyoajan bakteri kültürleri ise dondurucudan çıkarılarak Nutrient Agar (NA-Oxoid) besi ortamı içeren petrilere ekilmiş, 27°C’de inkübasyona bırakılarak 24 saatlik taze kültürleri elde edilmiştir. Gelişen taze bakteri kültürlerinden steril swap ile alınarak sdH₂O ile süspansiyon edilmiş ve hücre konsantrasyonu 1x10⁸ hücre/ml’ye ayarlanmıştır. Patojen fungusun PDA da gelişen kültüründen alınan 6 mm çapındaki diskler PDA besi ortamı içeren petrilerin tam ortasına yerleştirilmiştir. Ortasına patojen inokule edilen bu petrilerin etrafına ise konsantrasyonu 1x10⁸ hücre/ml’ye ayarlanmış bakteri kültürleri çizilmiştir. Kültürler parafilmle kaplanarak 24°C’de, 15 saat aydınlık ve 9 saat karanlık şartlarda, 7 gün geliştirilmiştir. Kontrol uygulamasında ise sadece fungal disk konulmuştur. Kontrol uygulamasında gelişen fungal diskin tüm petri yüzeyini kapladığı gün değerlendirmeler yapılmış ve patojen fungusun gelişen koloni çapı mm olarak ölçülmüştür. Her bakteri 3 petride test edilmiş ve bu 3 petriden elde edilen değerler yardımıyla biyoajanın oluşturduğu ortalama inhibasyon zonu belirlenmiştir (Kotan vd. 2009).

3.2.3. Kitinaz enzimi için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Tuzla çöktürme proteinlerin konsantre edilmesinde ve saflaştırılmasında geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Ortama eklenecek nötral tuz, genellikle denatürasyona yol açmadan, proteinlerin agregasyonuna (bir araya gelmelerine) ve çözeltiden ayrılarak çökmelerine yol açar. Proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çöktürülerek

birbirlerinden ve çözültideki diğer moleküllerden ayrılabilir. Çöktürme işleminde genellikle etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, pH'yı fazla etkilemeyen, çözültide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve etkin bir tuz olan amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ kullanılır. Bu nedenle yöntem amonyum sülfat çöktürmesi adıyla da bilinmektedir (Çağlar 2005).

Nutrient Agarda gelişen bakteriler, hazırlanmış olan Nutrient Broth (Oxoid) besiyerine inoküle edilerek bakterilerin sıvı kültür ortamına aktarılması sağlanmıştır. 28°C'de 48 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra da +4°C'de 48 saat tutulmuştur. 9000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant (üst faz) ve çökelti ayrılmıştır. Santrifüjleme sonrası çökelti atılmış ve süpernatant kısmı ile işleme devam edilmiştir. Enzimin çöktüğü amonyum sülfat doygunluk aralığını bulmak için gerekli olan amonyum sülfat miktarı aşağıda verilen formül ile hesaplanarak bulunmuştur. Kitinaz enzimi için her amonyum sülfat doygunluk aralığında çökelek ve süpernatantta enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık kitinaz enziminin amonyum sülfat doygunluk aralığı olarak kabul edilmiştir.

$$G_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = 1.77 \times V \times (S_2 - S_1) / (3.54 - S_2)$$

- $G_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$: Eklenmesi gereken katı amonyum sülfat tuzunun gram miktarı
 V : Enzim çözeltisinin (süpernatant) hacmi
 S1 : Başlangıçtaki amonyum sülfat doygunluğu (1' in kesri olarak)
 S2 : İstenen amonyum sülfat doygunluğu (1' in kesri olarak)

%0-20 aralığı için, gerekli olan amonyum sülfat tartılmış ve +4°C'de manyetik karıştırıcı üzerinde yavaş yavaş enzim çözeltisine ilave edilerek karışması sağlanmıştır. Ardından karışım 9000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelek pH'sı 7,0 olan 0,1 M Tris tamponunda çözülerek aktivite analizlerinde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır. Elde edilen süpernatanta %20-40 aralığı için gerekli olan amonyum sülfat tartılarak yavaş yavaş ilave edilmiştir. Karışım 9000 rpm'de +4°C'de

10 dakika santrifüj edilmiştir ve yine çökelek pH'sı 7,0 olan 0.1 M Tris tamponunda çözülerek aktivite tayini için +4°C'de saklanmıştır. Aynı işlemler %40-60 ve %60- 80 aralığı için de yapılmıştır. Son çöktürme işleminin ardından elde edilen süpernatantta ve çökeleklere aktivite tayini yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra elde edilen %0-20 aralığındaki çökelekler diyaliz membranına doldurularak +4°C' de pH'sı 6,0 ve molaritesi 0,02 olan sodyum sitrat tamponuna karşı 1 saat diyaliz yapılmıştır.

Amonyum sülfat çöktürmesi uzun zamandan beri pek çok araştırmacı tarafından kullanılan kısmi saflaştırma metodudur. Bu metodla numune içerisindeki birçok safsızlıklar elimine edilir ve proteinler daha derişik halde elde edilir. Diyalizin yapılması ise ortamdaki amonyum sülfat ve enzim aktivitesini etkileyen diğer iyonların uzaklaştırılması açısından önemlidir (Çiftçi ve ark 2003).

3.2.4. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Kitinaz enzimi aktivitesi ölçülürken her aralıkta elde edilen çökeleklere ve çöktürme sonrası elde edilen süpernatantlara aktivite tayini yapılmıştır. Bu sayede kitinaz enziminin aktif olduğu aralıklar tespit edilmiştir. Bunun için;

1. 200 µL enzim çözeltisi ile 500 µL substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika 37°C'ye ayarlanmış benmaride (su banyosu) reaksiyona sokulmuştur.
2. Su banyosundan çıkarılan tüplere 750 µL renklendirme çözeltisi eklendikten sonra 10 dakika 80°C'ye ayarlı su banyosunda bekletilerek reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır.
3. Su banyosundan çıkarılan örneklerin üzerine 1300 µL distile saf su koyulmuştur.
4. Örnekler kör kullanılarak (500 µL substrat +750 µL renklendirme çözeltisi + 1500 µL saf su) 540 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.2.5. Enzimin optimum pH değerinin saptanması

Kitinaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için;

- Sodyum asetat (pH 2,0-3,0),
- Sodyum sitrat (pH 4,0-6,0),
- Tris (pH 7,0-9,0),
- Sodyum karbonat (pH 10,0-11,0) tamponları kullanılmıştır.

Farklı pH değerlerine sahip (pH 2,0-11,0) tamponlar kullanılarak içerisinde %0,05 kitin bulunan substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Aktivite tayini için 200 µL enzim çözeltisi ile 500 µL substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika 37°C'ye ayarlanmış benmaride (su banyosu) 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 olarak üzerine 1300 µL distile saf su koyulup köre karşı 540 nm'de spektrofotometrede ölçölmüştür.

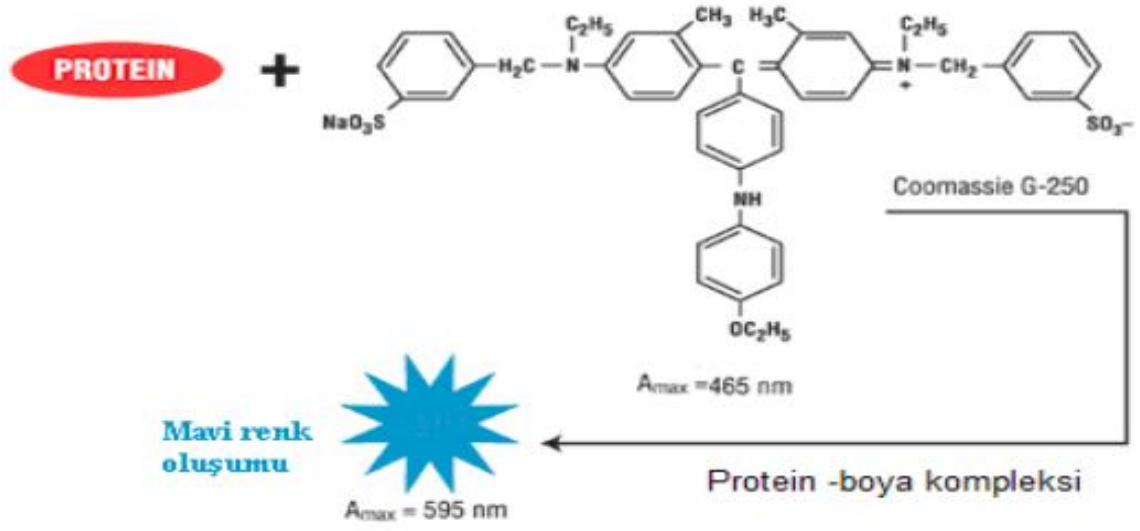
3.2.6. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması

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

3.2.7. Bradford metodu ile protein miktarı tayini

Bradford metodu, bir örnek içersindeki protein miktarının kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde boya olarak, proteinlerdeki pozitif yüke bağlanan negatif yüklü Commassie Brilliant Blue G-250 kullanılmaktadır. Asidik özeltelerde bu boyanın proteinlere bağlanması, boyanın maksimum absorpsiyonunun 465 nm (kırmızı) den 595 nm (mavi) ye kaymasına neden olmaktadır. Bu yöntemin

diğer protein tayin yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein boya kompleksinin çözeltisinde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976; Sarıbuğa 2013).



Şekil 3.2. Bradford reaksiyonu (Sarıbuğa 2013)

Protein miktarı tayini için yüksek aktivite gösteren çökeleklerden ve ham ekstraktan 0,1 ml alınmış, üzerlerine 5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Spektrofotometrede 595 nm'de saf suya karşı absorbanans değeri ölçülmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *İn-vitro* Petri Denemelerinin Sonuçları

Petri denemelerinde patojen fungusa karşı antifungal özellikleri bakımından test edilen toplam 9 farklı türe ait 158 izolatin etkili izolat sayıları ve oluşturdukları minimum-maksimum inhibasyon zon değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre toplam 158 izolatin 12 ile 37 mm arasında inhibasyon zonu oluşturdukları tespit edilmiştir. *Bacillus megaterium* türünden 10 izolatin, *Bacillus subtilis* türünden 8 izolatin, *Bacillus pumilus* türünden 6 izolatin, *Pseudomonas flourescens* türünden 2 izolatin, *Pseudomonas putida* türünden 3 izolatin, *Paenibacillus macerans* ve *Pantoea agglomerans* türlerinden 1’er izolatin patojene karşı etkili olduğu ve Petride fungal diskin gelişimini önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir. Test edilen *Bacillus thuringiensis* türünden 11 izolatin ve *Paenibacillus polymyxa* türünden 10 izolatin ise hiçbirisinin etkili olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan bakteri türlerinin *Fusarium culmorum*’a karşı test edilen izolatlarının etkili ve etkisiz izolat sayıları ve antifungal aktivite testinde fungal diskin çap aralığı

Bakteri cinsleri	Toplam İzolat sayısı	Etkisiz İzolat sayısı	Etkili İzolat sayısı	Fungal diskin çapı (mm)
<i>Bacillus megaterium</i>	46	36	10	19-35
<i>Bacillus subtilis</i>	21	13	8	15-37
<i>Bacillus pumilus</i>	19	13	6	15-35
<i>Pseudomonas flourescens</i>	15	13	2	13-28
<i>Pseudomonas putida</i>	15	12	3	19-34
<i>Paenibacillus macerans</i>	11	10	1	31
<i>Pantoea agglomerans</i>	10	9	1	12
<i>Bacillus thuringiensis</i>	11	11	0	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	10	10	0	-



Şekil 4.1. Bakteri izolatlarının petri denemelerinde patojen fungusun gelişimine etkisi 1: Kontrol uygulaması; 2 (*Pseudomonas fluorescens*),3 (*Bacillus megaterium*) ve 4 (*Bacillus subtilis*): Bakteri uygulamaları

Şekil 4.1’de petride kontrole karşılık gelen bakteri izolatlarının *Fusarium culmorum*’a karşı gelişimi incelenmiştir. En yüksek gelişim engelleyicinin *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolatına ait olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2. Antifungal petri denemelerinde etkili bulunan izolatların azot fiksasyonu ve fosfatı çözebilme özellikleri, patojen fungusun disk çapı, petride kitinaz aktivite test sonucu ve enzim aktivite değerleri

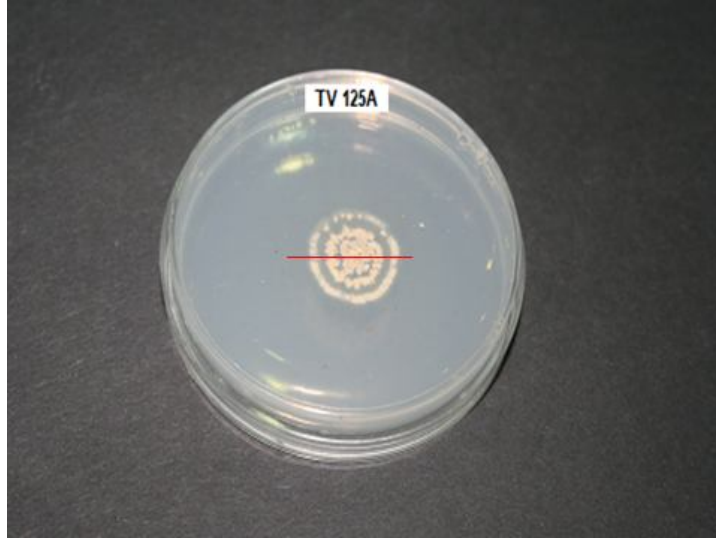
İzolat numarası	Kullanılan bakterilerin MIS Tanı sonucu	SİM	Azot fiksasyonu	Fosfatı çözebilme	Fungal diskin çapı (mm)	Petride kitinaz aktivitesi	Enzim (EU/ml.dak)
RK 79	<i>Pantoea agglomerans</i>	0,762	+	+	12	+	20,70
MF 1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,765	+	+	13	+	74,81
TV 91C	<i>Bacillus megaterium</i>	0,474	+	Z+	15	+	19,81
TV 17C	<i>Bacillus subtilis</i>	0,677	K+	Z+	15	+	21,59
TV 20E	<i>Bacillus megaterium</i>	0,519	+	-	15	+	15,97
RK 103	<i>Bacillus pumilus</i>	0,626	+	+	15	+	18,33
TV 125A	<i>Bacillus subtilis</i>	0,786	K+	Z+	19	+	24,87
TV 90E	<i>Bacillus megaterium</i>	0,591	+	-	19	+	19,52
TV 42A	<i>Pseudomonas putida</i>	0,765	Z+	Z+	19	+	21,88
TV 95A	<i>Bacillus megaterium</i>	0,502	K+	Z+	19	+	14,76
RK 142	<i>Pseudomonas putida A</i>	0,567	Z+	Z+	19	+	21,29
TV 6D	<i>Bacillus megaterium</i>	0,750	+	+	19	+	11,83
BA 140	<i>Bacillus subtilis</i>	0,598	+	+	25	+	15,67
TV 6F	<i>Bacillus subtilis</i>	0,831	K+	-	25	+	14,19
TV 12H	<i>Bacillus subtilis</i>	0,744	K+	-	25	+	19,52

Çizelge 4.2. (Devam) Antifungal petri denemelerinde etkili bulunan izolatların azot fiksasyonu ve fosfatı çözebilme özellikleri, patojen fungusun disk çapı, petride kitinaz aktivite test sonucu ve enzim aktivite değerleri

İzolat numarası	Kullanılan bakterilerin MIS Tanı sonucu	SIM	Azot fiksasyonu	Fosfatı çözebilme	Fungal diskin çapı (mm)	Petride kitinaz aktivitesi	Enzim (EU/ml.dak)
TV 13B	<i>Bacillus subtilis</i>	0,687	K+	Z+	26	+	18,33
TV 67C	<i>Bacillus pumilus</i>	0,630	-	-	26	+	15,38
TV 83A	<i>Bacillus pumilus</i>	0,568	K+	-	26	+	15,08
KBA 10	<i>Bacillus megaterium</i>	0,490	K+	Z+	27	+	16,56
TV 13C	<i>Bacillus megaterium</i>	0,595	+	Z+	27	+	13,01
TV 22B	<i>Bacillus megaterium</i>	0,431	K+	Z+	27	+	13,01
TV 83E	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,366	K+	Z+	28	+	13,01
KK 18	<i>Paenibacillus macerans</i>	0,840	+	+	31	+	20,11
RK 240	<i>Bacillus pumilus</i>	0,735	+	-	32	+	17,45
TV 73F	<i>Bacillus pumilus</i>	0,594	K+	Z+	34	+	13,01
TV 77B	<i>Bacillus subtilis</i>	0,483	K+	-	34	+	17,15
TV 93B	<i>Bacillus subtilis</i>	0,732	K+	-	34	+	13,31
TV 89F	<i>Pseudomonas putida</i>	0,145	Z+	-	34	+	22,18
TV 59D	<i>Bacillus megaterium</i>	0,504	K+	-	35	+	13,90
TV 73A	<i>Bacillus pumilus</i>	0,650	K+	+	35	+	15,38
TV 103B	<i>Bacillus megaterium</i>	0,514	K+	-	35	+	13,60
TV 89E	<i>Bacillus subtilis</i>	0,690	K+	-	37	+	17,74

SIM: MIS tanı benzerlik indeksi, +: Pozitif, -: Negatif, K+: Kuvvetli pozitif, Z+: Zayıf pozitif

Kontrol göz önüne alınarak *Pseudomonas flourescens* MF-1'in ve *Bacillus subtilis* TV-125A'nın bulunduğu ortamda Çizelge 4.2'de fungal disk çapları ve enzim aktivitesi değerleri karşılaştırılarak bu iki izolat ile kantitatif analizlere devam edilmiştir.

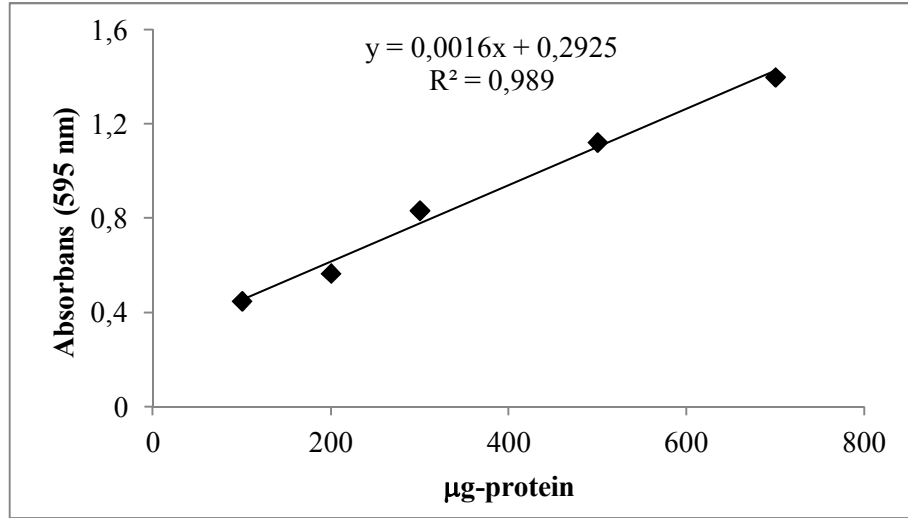


Şekil 4.2. Bakteri izolatlarından *Bacillus subtilis* TV-125A'nın petride kitinaz aktivitesinin belirlenmesi

Şekil 4.2'de petride yapılan kitinaz aktivitesinin *Bacillus subtilis* TV-125A izolatı için pozitif sonuç verdiği görülmektedir.

4.2. Protein Tayini İçin Kalibrasyon Grafiği

Kantitatif protein tayini Bradford metoduna göre yapılmıştır (Bradford 1976). Homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinden sonra elde edilen enzim çözeltileri, 1mg/ml konsantrasyonunda sığır serum albumin (SSA) çözeltisi kullanılarak hazırlanan standart grafik yardımı ile protein miktarı hesaplanmıştır. Bulunan protein miktarı Şekil 4.3'deki grafikten faydalanılarak hesaplanmıştır. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Bradford metoduyla protein tayini için kalibrasyon grafiği

4.3. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

Ekstraktardan santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlara çöktürme işlemi Bölüm 3.2.3’de anlatıldığı gibi sırasıyla 0-20, 20-40, 40-60 ve 60-80 aralıklarında yapılmıştır.

Çizelge 4.3. *Pseudomonas fluorescens* MF-1 için $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürme aralıkları ve bu aralıklarda belirlenen enzim aktivite değerleri

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Çöktürme Aralığı	ÇÖKELEK			SÜPERNATANT		
	Toplam hacim (mL)	Enzim (EU/mL.dak)	Toplam Aktivite	Toplam hacim (mL)	Enzim (EU/mL.dak)	Toplam Aktivite
Homojenat	-	0		50	341,5	17075
%0-20	5	208,5	1042,5	50	241,1	12055
%20-40	1	9,17	9,17	53	103,5	5485,5
%40-60	1	66,24	66,24	55	79,5	4372,5
%60-80	1	11,24	11,24	58	0	0

Çizelge 4.4. *Bacillus subtilis* TV-125A için $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürme aralıkları ve bu aralıklarda belirlenen enzim aktivite değerleri

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Çöktürme Aralığı	ÇÖKELEK			SÜPERNATANT		
	Toplam hacim (mL)	Enzim (EU/mL.dak)	Toplam Aktivite	Toplam hacim (mL)	Enzim (EU/mL.da k)	Toplam Aktivite
Homojenat	-	-	-	50	44,95	2247,5
%0-20	1	56,5	56,5	50	21,2	1060
%20-40	1	9,17	9,17	53	17,5	927,5
%40-60	1	4,14	4,14	56	8,8	492,8
%60-80	1	10,65	10,65	59	4,73	279,1

Pseudomonas fluorescens MF-1 ve *Bacillus subtilis* TV-125A izolatlarına ait kitinaz enzimlerinin kısmi saflaştırılması aşamalarında uygulanan her bir yöntem ve basamak için elde edilen örneklerde protein miktarı ve aktivite (EU/mL) ve spesifik aktivite belirlenerek saflaştırma tabloları oluşturulmuştur (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5. *Pseudomonas fluorescens* MF-1'den kitinaz enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamakları	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam Aktivite		Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Saflaştırma Katı
			EU	%			
Ham Ekstrakt	50	68,31	3415,3	100	6,44	10,61	-
Amonyum sülfat Çöktürmesi (%0-20)	5	210,5	1052,5	30,8	0,85	247,65	23,34

Çizelge 4.6. *Bacillus subtilis* TV-125A'dan kitinaz enziminin saflaştırma basamakları

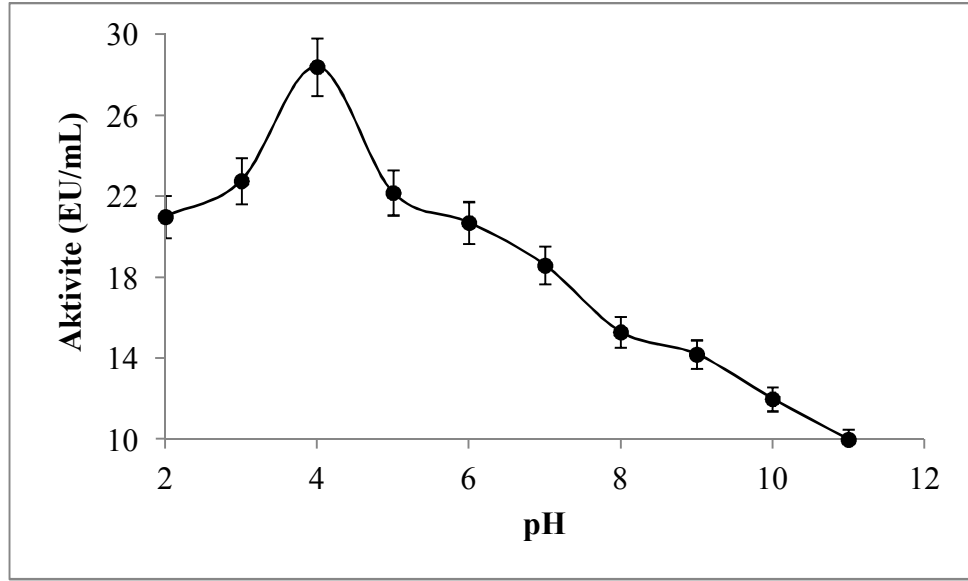
Saflaştırma Basamakları	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam Aktivite		Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Saflaştırma Katı
			EU	%			
Ham Ekstrakt	50	44,95	8155	100	6,46	6,95	-
Amonyum sülfat Çöktürmesi (%0-20)	5	255,5	1277,5	15,7	1,64	155,79	22,42

4.4. *Pseudomonas fluorescens* MF-1 ve *Bacillus subtilis* TV-125A'dan Üretilip Saflaştırılan Kitinaz Enziminin Optimum pH Sonuçları

Pseudomonas fluorescens MF-1 ve *Bacillus subtilis* TV-125A'dan üretilip saflaştırılan kitinaz enziminin optimum pH' sını belirlemek için Bölüm 3.2.5.'de anlatıldığı gibi ölçümler yapılmıştır. Optimum pH için, pH 2,0-11,0 aralığında farklı pH ortamlarında çalışılmıştır. Farklı pH ortamları için;

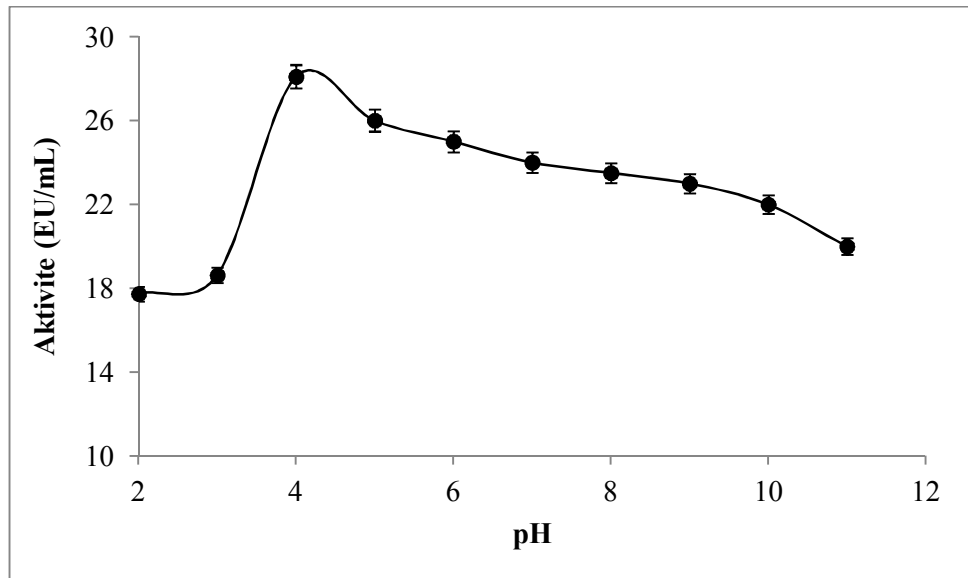
- Sodyum asetat (pH 2,0-3,0),
- Sodyum sitrat (pH 4,0-6,0),
- Tris (pH 7,0-9,0)
- Sodyum karbonat (pH 10,0-11,0) tamponları kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplanıp, pH ve aktivite arasındaki ilişki grafikler ile ifade edilmiştir. Elde edilen optimum pH sonuçları *Pseudomonas fluorescens* MF-1 için Şekil 4.4 ve *Bacillus subtilis* TV-125A için Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.4. *Pseudomonas fluorescens* MF-1'den elde edilen kitinaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Pseudomonas fluorescens MF-1'e ait kitinaz enziminin optimum pH değeri 4,0 olarak bulunmuş, en yüksek aktivitenin bu pH değerinde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4).



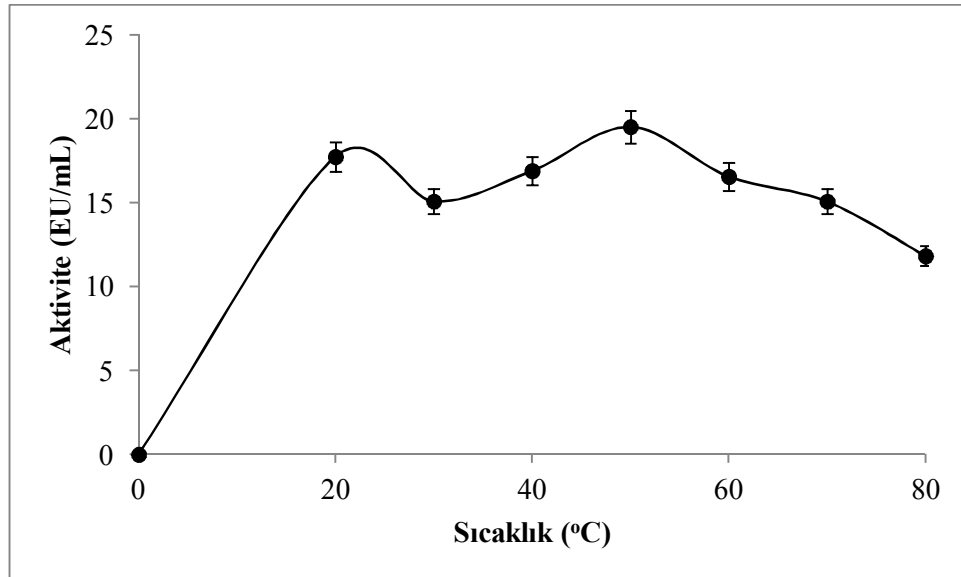
Şekil 4.5. *Bacillus subtilis* TV-125A'dan elde edilen kitinaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Şekil 4.5’de görüldüğü gibi *Bacillus subtilis* TV-125A’dan elde edilen kitinaz enziminin en yüksek aktivitede gösterdiği pH değeri 4,0 olarak bulunmuştur.

4.5. *Pseudomonas fluorescens* MF-1 ve *Bacillus subtilis* TV-125A’dan Elde Edilen Kitinaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları

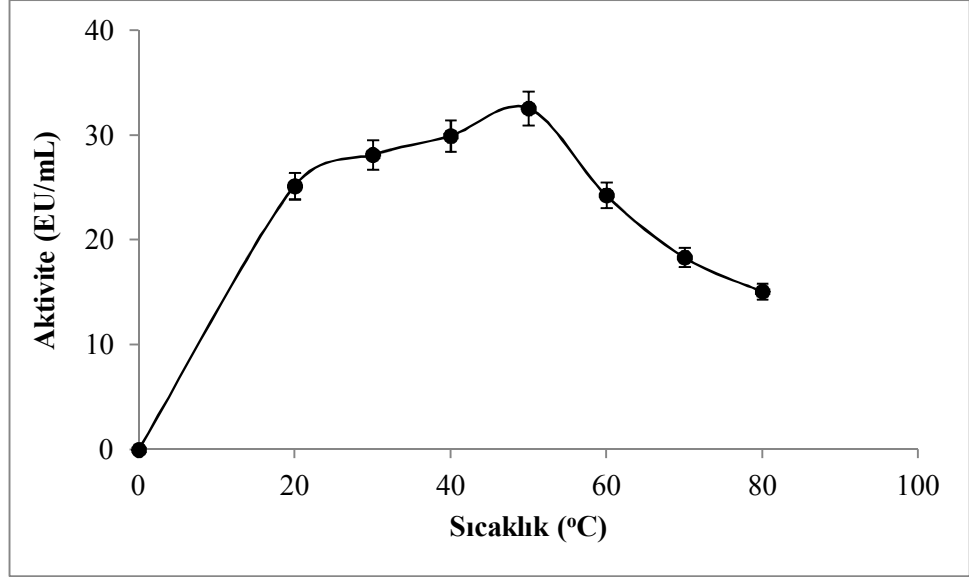
Pseudomonas fluorescens MF-1 ve *Bacillus subtilis* TV-125A’dan elde edilen kitinaz enziminin optimum sıcaklıklarını belirlemek için 3.2.6’de anlatıldığı gibi ölçümler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplanıp, sıcaklık ve aktivite arasındaki ilişki grafikler ile ifade edilmiştir. Optimum sıcaklık sonuçları *Pseudomonas fluorescens* MF-1 için Şekil 4.6 ve *Bacillus subtilis* TV-125A için de Şekil 4.7’da verilmiştir.

Şekil 4.6’da görüldüğü gibi *Pseudomonas fluorescens* MF-1’e ait kitinaz enziminin optimum sıcaklık değeri 50°C olarak saptanmıştır.



Şekil 4.6. *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolati’ndan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan kitinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Bacillus subtilis TV-125A'ya ait kitinaz enziminin optimum sıcaklık değeri Şekil 4.7'de görüldüğü gibi 50°C olarak saptanmıştır.



Şekil 4.7. *Bacillus subtilis* TV-125A'dan ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan kitinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Petride *Fusarium culmorum*'a karşı yapılan antifungal aktivite testlerinde Çizelge 4.1'de verilen 158 izolattan 31'i pozitif sonuç vermiştir. Antifungal test sonucunda elde edilen izolatların pozitif sonuçları yüzde olarak ifade edecek olursak yaklaşık %77'si *Bacillus* izolatlarına aittir. *Bacillus* izolatlarından pozitif sonuç verenlerin yaklaşık olarak %32'si *Bacillus megaterium*, %26'sı *Bacillus subtilis*, %19'u ise *Bacillus pumilus*'a aittir. Bu izolatların dışında pozitif sonuç verenlerin yaklaşık %7'si *Pseudomonas fluorescens*'e, %10'u *Pseudomonas putida*'ya ve %3'ü ise *Paenibacillus macerans* ve *Pantoea agglomerans*'a ait olduğu saptanmıştır.

Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi yapılan petri denemeleri sonucunda Şekil 4.1'de fungal disk çaplarının, uygulanan izolatlara göre değiştiği görülmektedir. Çizelge 4.2'de verilen *Pantoea agglomerans* RK 79'un 12 mm zon çapı, *Pseudomonas fluorescens* MF 1'in ise 13 mm zon çapı oluşturduğu bulunmuştur. *Bacillus megaterium* TV 91C, *Bacillus subtilis* TV 17C, *Bacillus megaterium* TV 20E ve *Bacillus pumilus* RK 103'ün zon çaplarının ise 15 mm olduğu saptanmıştır. Ayrıca *Bacillus subtilis* TV 125A, *Bacillus megaterium* TV 90E, *Pseudomonas putida* TV 42A, *Bacillus megaterium* TV 95A, *Pseudomonas putida* A RK 142 ve *Bacillus megaterium* TV 6D izolatlarının oluşturduğu zon çapının ise 19 mm olduğu tesbit edilmiştir. Bu sonuçlara göre izolatların *Fusarium culmorum*'a karşı yüksek antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Antifungal testler ışığında 31 izolata kitinaz enzimi aktivite tayini yapılmıştır. Kontrol göz önüne alınarak *Pseudomonas fluorescens* MF-1'in ve *Bacillus subtilis* TV-125A'nın bulunduğu ortamda fungal disk çapları ve enzim aktivitesi değerleri karşılaştırılarak bu iki izolatın yüksek kitinaz enzimi aktivitesine sahip olduğu ve bu sayede de *Fusarium culmorum*'a karşı antifungal aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Kang and Buchenauer (2002) yaptıkları çalışmada *Fusarium culmorum*'un enfekte olduğu buğday başağında biriken kitinaz enziminin ev sahibi dokuda patojen yayılmasına karşı direnç oluşturabileceğini saptamışlardır.

Ghasemi *et al.* (2011) *Bacillus pumilus* SG2 bakterisinden saflaştırdıkları kitinaz enziminin *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma reesei*, *Botrytis cinerea* and *Bipolaris sp.*'e, Lang *et al.* (2001) *Bacillus subtilis*'ten elde ettikleri fungusit özeliğindeki kurutulmuş bakteri hücrelerinin *Fusarium oxysporum*'a, Yan *et al.* (2011) *Bacillus subtilis* SL-13 kitinaz enziminin *Rhizoctonia solani*'ye, Sindhu and Dadarwal (2001) *Pseudomonas* suşlarından elde ettikleri kitinaz enziminin *Pythium aphanidermatum* (Oomycete) ve *Rhizoctonia solani* (Basidiomycete)'ye, Nielsen *et al.* (1999), kitinolitik aktivite gösteren *Pseudomonas fluorescens*'in 12 izolatının *Pythium ultimum* ve *Rhizoctonia solani*'ye karşı anti-fungal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Nitekim, literatüre geçen bu çalışmaların elde edilen sonuçlarımızı destekler nitelikte olduğu anlaşılmaktadır.

Ayrıca çalışmalarda saflaştırılan kitinaz enziminin; Kim *et al.* (2002) *Botrytis cinerea* fungusun hücre duvarında lizozimal etki gösterdiğini, Vaidya *et al.* (2003) saflaştırdıkları kitinaz enzimin *Aspergillus niger* misellerini parçaladığı ve Ma *et al.* (2012) çeşitli patojenik bitki mantarlarının çimlenmesini ve hifal büyümesini engellediğini belirtmişlerdir.

Kontrol göz önüne alınarak *Pseudomonas flourescens* MF-1'in ve *Bacillus subtilis* TV-125A'nın bulunduğu ortamda (Çizelge 4.2'de) fungal disk çapıları ve enzim aktivitesi değerleri karşılaştırılarak bu iki izolat ile kantitatif analizlere devam edilmiştir.

Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi yapılan amonyum sülfat çöktürmesi metoduyla %0-80 aralığında adım adım çöktürme yapıлып kitinaz enzimi aktivitesine bakılmıştır. *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolatında %0-20 aralığındaki çökelekte 208,5

(EU/ml.dak), *Bacillus subtilis* TV-125A izolatında da %0-20 aralığındaki çökelekte 56,5 (EU/ml.dak) değerleri bulunmuştur. Diğer çökelek basamaklarında her iki bakteri izolatu için çıkan değerler daha düşük olduğundan yapılan çalışmalar için %0-20 çökeleklerinden ayrı ayrı havuzlar oluşturulup çalışmalar bu havuzlardan devam ettirilmiştir.

Pseudomonas fluorescens MF-1 izolatında %0-20 çöktürme aralığında %30,8 verimle 23,34 kat ve *Bacillus subtilis* TV-125A izolatından %0-20 çöktürme aralığında %15,7 verimle 22,34 kat kısmi saflaştırma yapılmıştır.

Pseudomonas fluorescens MF-1 ve *Bacillus subtilis* TV-125A'dan üretilip saflaştırılan kitinaz enziminin optimum pH'larını bulmak için pH 2,0-11,0 aralığı taranmıştır. Taramalar sonucunda her iki izolatında optimum pH değerleri Şekil 4.4 ve 4.5'de görüldüğü gibi 4,0 olarak tespit edilmiştir. *Pseudomonas fluorescens* MF-1 ve *Bacillus subtilis* TV-125A izolatlarında pH 4,0-11,0 aralığındaki aktivitelerinde ise çok fazla bir düşüş saptanmamıştır. *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolatu pH 11,0'de %36 aktivitesini korurken, *Bacillus subtilis* TV-125A izolatu pH 11,0'de aktivitesinin %71'ini koruduğu saptanmıştır.

Watanabe *et al.* (1992) ve Yabuki *et al.* (1986)'a göre pek çok kitinazın asidik olduğu belirtilmiştir. Okay (2005), *S. marcescens* Bn10 kitinaz enziminin pH 4,0-9,0 aralığında yüksek aktivite gösterdiği ve Ma *et al.* (2012) *Gliocladium catenulatum*'dan izole ettikleri ve saflaştırdıkları kitinaz enziminin aktivitesi pH 4,0-5,0 aralığında stabil olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmalar bizim elde ettiğimiz sonucu da destekler nitelikte bulunmuştur.

Zhang *et al.* (2000) *Stenotrophomonas maltophilia* C3 kitinaz enziminin pH 4,5-5,0, Vaidya *et al.* (2003) *Alcaligenes xylosoxydans* kitinaz enziminin pH 5,0, Ghasemi *et al.* (2011), İran'da yüksek tuzluluğa sahip ortamdan izole ettikleri *Bacillus pumilus* SG2 bakterisinin ChiS kitinaz enzimi için pH 6,0, ChiL kitinaz enzimi için pH 6,5, Yan *et al.*

(2011) *Bacillus subtilis* SL-13 kitinaz enziminin pH 7,0, Yuli *et al.* (2004) *Bacillus* sp. 13.26 kitinaz enziminin pH 7,8, Yakupoğlu (2009) *Serratia marcescens* kitinaz B'nin pH 9,0 kitinaz C'nin ise pH 8,5 ve Kuzu (2008) *B. thuringiensis* HBK-51 suşunun kültür süpernatantından elde ettiği kitinazın pH 9,0' da optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Pseudomonas fluorescens MF-1 ve *Bacillus subtilis* TV-125A'dan üretilip saflaştırılan kitinaz enziminin optimum sıcaklıklarını bulmak için 20-80°C sıcaklık aralığında aktivite tayinleri yapılmıştır. İki izolatın da optimum sıcaklığı Şekil 4.6 ve 4.7'de görüldüğü gibi 50°C olarak bulunmuştur. Sıcaklık yükseltiğinde her iki izolatın kitinaz enzim aktivitesini büyük düzeyde koruduğu, inhibe olmadığı belirlenmiştir. *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolatının 80°C'de %50 aktivitesini korurken, *Bacillus subtilis* TV-125A izolatının ise %42 aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

Yan *et al.* (2011), *Bacillus subtilis* SL-13 kitinaz enziminin 50°C, Vaidya ve ark. (2003), *Alcaligenes xylosoxydans* kitinaz enziminin 50°C, Brushan ve Hoondal (1998) *Bacillus* kitinaz enzimlerinin 45-55°C, Ghasemi *et al.* (2011) *Bacillus pumilus* SG2 bakterisinin ChiS kitinaz enziminin 50°C, Zhang *et al.* (2000) *Stenotrophomonas maltophilia* C3 kitinaz enziminin 45-50°C sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar bizim elde ettiğimiz sonuçları da destekler nitelikte bulunmuştur.

Ayrıca Yuli *et al.* (2004) *Bacillus* sp. 13.26 kitinaz enziminin 60°C, Ghasemi *et al.* (2011) *Bacillus pumilus* SG2 bakterisinin ChiL kitinaz enzimi için 40°C, Kuzu (2008) *B. thuringiensis* HBK-51 suşunun kültür süpernatantından elde ettiği kitinaz enziminin 110°C, Yakupoğlu (2009) *Serratia marcescens*'e ait kitinaz B enziminin 35°C, kitinaz C enziminin ise 33°C, Okay (2005) *S. marcescens* Bn10'a ait kitinaz enziminin 45°C, Ma *et al.* (2012) *Gliocladium catenulatum*'dan izole ettikleri ve saflaştırdıkları kitinaz enziminin 60°C' de sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Gelişen teknolojiyle beraber çağımızda mikrobiyal enzimlerin kullanım alanları ve önemleri oldukça artmıştır. Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin geniş alanda kullanımının sebepleri arasında; doğadan kolaylıkla elde edilmesi, basit ve ekonomik yollarla geliştirilmesi ve yüksek aktivitede enzimi sentezlemesi sayılabilir.

Elde ettiğimiz sonuçları endüstriyel açıdan değerlendirecek olursak;

1. *Fusarium culmorum*'a karşı antifungal aktivite gösteren ve kitinaz enzimi üretebilen *Bacillus subtilis* TV-125A ve *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolatları biyokontrol ajanı olarak tarımda kullanılabilir.
2. *Bacillus subtilis* TV-125A ve *Pseudomonas fluorescens* MF-1 izolatları ürettikleri kitinaz enzimi sayesinde, böceklerin kabuklarında ve mantarların hücre duvarında bulunan kitini parçaladığı için diğer böceklere karşı insektisit ve funguslara karşı da fungusit olarak kullanılmaları mümkündür. Özellikle *P. Fluorescens* MF-1 izolatının yüksek kitinaz aktivite göstermesi, fungusit ve insektisit özelliğinin daha etkili olacağının bir göstergesidir.
3. İzolatların ürettiği kitinaz enziminin ayrıca mantar enfeksiyonlarına karşı tıp alanında da uygulanabilirliği vardır.
4. Öte yandan bu izolatların ürettiği kitinaz enziminin, doğada atık olarak bulunan kabuklu deniz canlılarının kabuklarında bulunan kitini hidrolize etmesi sayesinde bu kabukların değerlendirilmesi ve çevre kirliliğinin önüne geçilmesi sağlanabilir. Ayrıca çevre alanında yapılacak biyoremediasyon çalışmalarında alternatif ve etkili bir yöntem olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Açikel, Y.Ş. ve Çelebi, B., 2006. R. delemar ile Lipaz Üretimi. Tübitak Projesi, Misag-282.
- Adams, D.J., 2004. Fungal cell walls chitinases and glucanases. *Microbiol.*, 150, 2029-2035.
- Aehle, W., 2004. *Enzymes in Industry. Production and Applications*, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. Kga, Weinheim.
- Alyüz, B. ve Veli, S., 2005. Low-cost adsorbents used in heavy metal contaminated waste water treatment. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 3, 94-105.
- Anonim, 2007. Megep, Gıda Teknolojisi, Enzimlerin Özellikleri, (http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/gida/moduller/enzimlerin_ozellikleri.pdf).
- Aygan, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* Sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Batur, A., 2012. Biyoteknoloji, <http://www.kirklareli.edu.tr/download//by-files/50353588.html>, (19.11.2013).
- Bhushan, B. and Hoondal, G.S., 1999. Effect of Fungicides, Insecticides and Allosamidin on a Thermostable Chitinase from *Bacillus* sp. BG-11. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15, 403-404.
- Bostan, K., Aldemir, T. ve Aydın, A., 2007. Kitosan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 37 (2), 118-127.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-251.
- Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B. and Silverman, S.J., 1989. Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 108, 1665-1672.
- Çağlar, Z., 2005. *Trichoderma Atroviride'den Elde Edilen Kitinazın Kısmi Saflaştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Cauchie, H.M., 2002. Chitin production by arthropods in the hydrosphere. *Hydrobiology*, 470, 63-96.
- Chandrasekaran, R., Revathi, K., Nisha, S., Kirubakaran, S.A., Sathish-Narayanan, S. and Senthil-Nathan, S., 2012. Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104, 65-71.

- Chang, C.T., Lo, H.F., Wu, C.J. and Sung, H.Y., 2007. Purification And Properties of Chitinase From Cabbage. *International Journal of Biochemistry*, 28, 707-715.
- 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.
- Chen, J.P. and Chang, K.C., 1994. Immobilization of chitinase on a reversibly soluble-insoluble polymer for chitin hydrolysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 60, 133-140.
- Chet, I., 1993. *Biotechnology in Plant Disease Control*. Wiley-Liss, New York.
- Cho, Y.I., No, H.K. and Meyers, S.P., 1998. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3839-3843.
- Çiftçi, M., Adıgüzel, A., Erat, M. ve Şahin, M., 2004. *Bacillus* sp. (BA-142) Bakterisinden Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Kısmen Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 35 (4), 151-158.
- Demir, A. ve Seventekin, N., 2009. Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3(2), 92-103.
- Deshpande, M.V., 1986. Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 45 (6), 273-281.
- Dubourdieu, D., Desplanges, C., Villettaz, J.C. and Ribereaugayon, P., 1985. *Carbohydrate Research*, 144 (2), 277.
- Flach, J., Pilet, P.E. and Jolles, P., 1992. What's new in chitinase research?. *Experientia*, 48, 701-716.
- Ghasemi, S., Ahmadian, G., Sadeghi, M., Zeigler, D.R., Rahimian, H., Ghandilia, S., Naghibzadeh, N. and Dehestani, A., 2011. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 225–231.
- Gökalp, H.Y., Nas, S. ve Certel, M., 2002. *Biyokimya – I. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları*, No: 210 s, Denizli.
- Gooday G.W., 1994. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan, In: C. Ratledge editor. *Biochemistry and microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 279-312.
- Gooday, G.W. and Trinci, A.P.J., 1980. Wall structure and biosynthesis in fungi. In: Gooday, G.W., Lloyd, D. and Trinci, A.P.J., Editors, *The Eukaryotic Microbial Cell*, p. 207-251.” Society for General Microbiology, Cambridge.
- Gooday, G.W., 1995. Diversity of roles for chitinases in nature. In: Zakaria M.B., Wan Muda W.M., Abdullah M.P., Editors. *Chitin and Chitosan*. Malaysia Penerbit Universiti Kebangsaan, p. 191-202.
- Harman, G.E. and Kubicek, C.P., 1998. *Trichoderma and Gliocladium*, Vol.2, *Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. Taylor & Francis, London.

- Harman, G.E., 2000. The myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* strain T-22. *Plant Disease*, 84 (4), 377-393.
- Hoell, I. A., Klemsdal, S. S., Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J. and Eijsink, V.G.H., 2005. Overexpression and characterization of a novel chitinase from *Trichoderma atroviride* strain P1. *BBA-Proteins & Proteomics*, 1748, 2, 180-190.
- İmamoğlu, Ö., 2011. Biyokontrolde Doğal Ürünlerin Kullanılması; Kitosan. *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(4), 215-22.
- Kalisz, H. M., 1988. *Microbial Enzymes. Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*, Springer, Berlin Heidelberg, New York, 36, 3-61.
- Kang, Z. and Buchanauer, H., 2002. Immunocytochemical localization of β -1,3-glucanase and chitinase in *Fusarium culmorum*-infected wheat spikes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60, 141-153.
- Keyhani, N.O. and Roseman, S., 1997. Wild-type *Escherichia coli* grows on the chitin disaccharide, N,N'-diacetylchitobiose, by expressing the cell operon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United, USA*, 94(26), 14367-14371.
- Keyhani, N.O., Wang, L.X., Lee, Y.C. and Roseman, S., 2000. The chitin disaccharide, N,N'-diacetylchitobiose, is catabolized by *Escherichia coli* and is transported/phosphorylated by the phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 33084-33090.
- Kılınç, N., 2011. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Koyun Midesinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı İlaçların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Kim, K-J., Yang, Y-J and Kim, J-G., 2002. Purification and Characterization of Chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36, No. 2, p. 185-189
- Kotan, R., Sahin, F., Demirci, E. and Eken, C., 2009. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. *Biological Control*, 50, 194-198.
- Kramer, K.J. and Koga, D., 1986. Insect chitin. Physiological state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochemistry*, 16, 851-877.
- Kumar, M.N.V.R., 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Kumaran, S., Deivasigamani, B., Vairagkar, U., Balamurugan, S. and Sakthivel, M., 2012. Evaluation of Chitinase producing and antimicrobial properties of streptomyces isolated from shrimp shell disposable area. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 861-864.
- Kuzgun, N.K. ve İnanlı, A.G., 2013. Kitosan Üretimi ve Özellikleri ile Kitosanın Kullanım Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6 (2), 16-21.

- Kuzu, S.B., 2008. Kitinaz Üreten Bacillus İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Lorito, M., Woo, S.L., Garcia Fernandez, I., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Mucciflora, S., Lawrence, C.B., Zonia, A., Tuzun, S., and Scala, F., 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United, USA, 95, 7860-7865.
- Ma, G-Z., Gao, H-L., Zhang, Y-H., Li, S-D., Xie, B-Y. and Wu, S-J., 2012. Purification and characterization of chitinase from Gliocladium catenulatum strain HL-1-1. African Journal of Microbiology Research, Vol. 6(20), 4377-4383.
- Madigan, T.M., Martinko, M.J. and Parker, J., 1997. Brock Biology of Microorganisms. International Edition, 8th Ed.
- Mcclery, B.V. and Matheson, N.K., 1987. Advances Carbonhydr. Chem. 44, 147.
- Mert, N., 2006. Enzimler. <http://mertnihat.com> (10.11.2013).
- Merzendorfer, H. and Zimoch, L., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. The Journal of Experimental Biology, 206, 4393-4412.
- Murao, S., Kawada, T., Itoh, H., Oyama, H. and Shin, T., 1992. Purification and characterization of a novel type of chitinase from Vibrio alginolyticus. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 56, 368-369.
- Muşabak, C., 2008. Kitosanla Kaplama ve Modifiye Atmosfer Ambalajlamannın Palamut (Sarda Sarda) Filetolarının Kimyasal Parametreleri Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Muzzarelli, R.A.A. and Muzzarelli, C., 1998. Native and modified chitins in the biosphere. ACS Symposium Series, 707, 148-162.
- Muzzarelli, R.A.A., 1977. Chitin. Pergamon Press, Oxford.
- Muzzarelli, R.A.A., Ilari, P., Tarsi, R., Dubini, B. and Xia, W., 1994. Chitosan from Absidia coerulea. Carbohydrate Polymers, 25, 45-50.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry. Chapter 6. W. H. Freeman, Fourth Edition.
- Nielsen, M.N. and Sorensen, J., 1999. Chitinolytic activity of Pseudomonas fluorescens isolates from barley and sugar beet rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology, 30, 217-227.
- No, H.K., Meyers, S.P. and Lee, K.S., 1989. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37(3), 575-579.
- Okay, S., 2005. Cloning of chitinase a gene (chia) from serratia Marcescens Bn10 and its expression in coleoptera-specific Bacillus thuringiensis. Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Park, J.K., Keyhani, N.O. and Roseman, S., 2000. Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Identification, molecular cloning and characterization of a *N,N'*-diacetylchitobiose phosphorylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 33077-33083.
- Patil, R.S., Ghormade, V. and Deshpande, M.V., 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 473-483.
- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.O., Chet, I., Wilson, K.S. and Vorgias C.E., 1994. Crystal Structure of a Bacterial Chitinase at 2.3 oA Resolution. *Structure*, 2, 1169.
- 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.
- Ramirez, M.G., Avelizapa, I.L.R., Avelizapa, N.G.R. and Camarillo, R.C., 2003. Colloidal Chitin Stained with Remozal Brilliant Blue R, A Useful Substrate to Select Chitinolytic Microorganisms and to Evaluate Chitinases. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 213-219.
- Roy, I., Sardar, M. and Gupta, M.N., 2003. Hydrolysis of chitin by Pectinex. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 582-588.
- Sampson, M.N. and Gooday, G.W., 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*, 144, 2189-2194.
- San-Lang, W., Shih, I-L., Wang, C-H., Tseng, K-C., Chang, W-T., Twu, Y-K., Ro, J-J. and Wang, C-L., 2002. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 321-328.
- Sarıbuğa, E., 2013. *Lactobacillus Plantarum* ve *Lactobacillus Acidophilus* Bakterilerinden Fitaz Enziminin Kısmen Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Shahidi, F. and Abuzaytoun, R., 2005. Chitin, chitosan, and coproducts: chemistry, production, applications, and health effects. *Advances in Food and Nutrition Research*, 49, 93-135.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. and Jeon, Y.J., 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37-51.
- Shaikh, S.A. and Deshpande, M.V., 1993. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(4), 468-475.
- Shen, Z. and Jacobs-Lorena, M., 1997. Characterization of a novel gut-specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 46, 28895-28900.
- Shepherd, R., Reader, S. and Falshaw, A., 1997. Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal*, 14, 535-542.

- Sindhu, S.S. and Dadarwal, K.R., 2001. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. *Microbiological Research*, 156, 353–358.
- Stryer, L., 1988. *Biochemistry*. Third Edition, W.H. Freeman and Company/Newyork.
- Subasinghe, S., 1995. The development of crustacean and mollusc industries for chitin and chitosan resources. In: Zakaria, M.B., Wan Muda, W.M., Abdullah, M.P., editors. *Chitin and Chitosan*. Malaysia Penerbit Universiti Kebangsaan, p. 27-34.
- 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.
- Synowiecki, J. and Al-Khatteb, N.A., 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 145-71.
- Tanaka, T., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T., 2003. Characterization of an exo- β -Dglucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic Archaeon *thermococcus kodakaraensis* KOD 1. *Journal of Bacteriology*, 185(17), 5175-5181.
- Terbojevich, M. and Muzarelli, R.A.A., 2000. *Chitosan*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. Press.
- Vaidya, R., Roy, S., Macmil, S., Gandhi, S., Vyas, P. and Chhatpar, H.S., 2003. Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes xylosoxydans*. *Biotechnology Letters*, 25, 715-717.
- Wang, S-L., Yen, Y-H., Tzeng, G-C. and Hsieh, C., 2005. Production of antifungal materials by bioconversion of shellfish chitin wastes fermented by *Pseudomonas fluorescens* K-188. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 49–56.
- Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., Ohnishi, K., and Tanaka, H., 1992. Structure of gene encoding chitinase-D, *Bacillus circulans* Wild type 12, and possible homology of the enzyme to other procaryotic chitinase and class-3 plant chitinases. *Journal of Bacteriology*, 174, 408-414.
- Wen, C.M., Tseng, C.S., Cheng, C.Y. and Lil, Y.K., 2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35, 213–219.
- Wiseman, A. 1987. *Handbook of Enzym Biotechnology*. Second Edition, Chapter 3, *The Application of Enzymes in Industry*, 274-373.
- Wiwat, C., Siwayaprahm, P. and Bhumiratana, A., 1999. Purification and Characterization of Chitinase from *Bacillus Circulans* No.4.1. *Current Microbiology*, 39, 134-140.

- Yabuki, M., Mizushima, K., Amatatsu, T., Ando, A., Fujii, T., Shimada, M. and Yamashita, M., 1986. Purification and characterization of chitinase and chitobiose produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes*. *Biotechnol Appl Biochem Biotechnology and Applied Biochemistry*, 32, 25-38.
- Yakupoglu, M., 2009. *Helicoverpa Armigera*'dan İzole Edilen *Serratia Marcescens* Bakterisine Ait Kitinaz A, B ve C Genlerinin Klonlanması, Karakterizasyonu, Ekspresyonu ve Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.
- Yan, L., Jing, T., Yujun, Y., Bin, L., Hui, L. and Chun, L., 2011. Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(1) 128-134.
- Yuli, E.P., Suhartono, T., Rukayadi, Y., Hwang, J.K. and Pyun, R.Y., 2004. Characteristics of Thermostable Chitinase Enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 147-153.
- Zeman, N.W. and McCrea, J.M., 1985. α -Amylase Production Using a Recombinant DNA Organism. *Cereal Foods World*, 30 (1), 777-780.
- Zhang, Z., Yuen, G.Y., Sarath, G. and Penheiter, A.R., 2000. Chitinases from the Plant Disease Biocontrol Agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Biological Control*, Vol. 91, No. 2, 204-211.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Erzurum ili Olur ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Muğla iline bağlı Yatağan ilçesinde, liseyi ise İzmir Tire Kutsan Anadolu Lisesi'nde tamamladı.

2008 yılında yükseköğrenime başladığı Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden, 2012 yılında iyi derece ile mezun oldu.

Lisans mezuniyetiyle birlikte, İzmir ve Erzurum illerindeki bazı özel gıda işletmeleri bünyesinde Gıda Mühendisi olarak mesleki hizmetlerde bulundu.

2012 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda lisansüstü öğrenimine başladı. Halen, Enzim ve Mikrobiyal Teknoloji alanındaki akademik çalışmalarına devam etmektedir.