



**ANTİFUNGAL AJAN ADAYI OLARAK  
BAKTERİYAL KİTİNAZ ÜRETİMİ  
VE KARAKTERİZASYONU**

**GÜLESME YILMAZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI  
PROF. DR. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ  
Ağustos - 2019  
Her hakkı saklıdır**

T.C.  
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTİFUNGAL AJAN ADAYI OLARAK BAKTERİYAL KİTİNAZ  
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

GÜLESME YILMAZ

TOKAT

Ağustos - 2019


Her hakkı saklıdır

**Gülesme YILMAZ** tarafından hazırlanan “**Antifungal Ajan Adayı Olarak Bakteriyal Kitinaz Üretimi ve Karakterizasyonu**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 26 AĞUSTOS 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

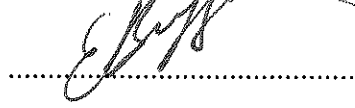
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ  
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi  
Üye  
Prof. Dr. Özlem AKPINAR  
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi  
Üye  
Doç. Dr. Ebru BEYZİ  
Gazi Üniversitesi

  
.....

  
.....

  
.....

ONAY

  
Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

24/09/2019

## **TEZ BEYANI**

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

**GÜLESME YILMAZ**  
**26 Ağustos 2019**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### ANTİFUNGAL AJAN ADAYI OLARAK BAKTERİYEL KİTİNAZ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

GÜLESME YILMAZ

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ)

Kitin molekülü fungusların hücre duvarı başta olmak üzere, karides ve yengeç gibi kabukluların ve böceklerin dış iskeletinin ana bileşenidir. Kitin sentezinin inhibisyonu, antifungal ajanlar için hedef durumundadır. Bu çalışmada endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir kitinaz enziminin, doğadan izole edilmesi, karakterizasyonun yapılması ve bazı fitopatojenlere karşı antifungal etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmada Yeşilirmak kenarından alınan toprak örneğinden kitinaz üreticisi mikroorganizmalar, koloidal kitin substratı kullanılarak selektif besiyerinde izole edilmiştir. Enzim aktivitesi dinitrosalisilik asit metodu ile kantitatif olarak ölçüldükten sonra, en yüksek kitinaz aktivitesine sahip mikroorganizmanın enzimi, amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle kısmi olarak saflaştırılmış ve antifungal özellikleri incelenmiştir. En yüksek zon çapı oluşturan organizma, 30. saatte 4,73 U/mg spesifik aktivite gösteren kitinaz enzimini üretmiştir. Üretilen enzim optimum 30<sup>0</sup>C ve optimum pH 7.0'de aktivite göstermektedir. *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium* organizmalarına karşı antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Enzim, koloidal kitine spesifik olarak daha yüksek aktivite göstermiştir. Kitinaz üreticisi olarak elde izole ettiğimiz bu mikroorganizma 16S rRNA dizi analizi ile *Aeromonas caviae* olarak tanımlanmıştır.

2019, 62 Sayfa

**ANAHTAR KELİMELER:** Antifungal, *Aeromonas caviae*, Kısmi saflaştırma, Kitinaz, SDS-PAGE

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

#### PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL KITINASE AS AN ANTIFUNGAL AGENT CANDIDATE

GÜLESME YILMAZ

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

**SUPERVISOR: Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELI**

The chitin molecule is the main component of the outer skeleton of shells and insects such as shrimp and crab, especially the cell wall of fungi. Inhibition of chitin synthesis is the target for antifungal agents. In addition to antifungal drugs, chitinase enzymes are also used in a variety of biotechnological applications, including the reuse of chitin, the second most abundant biopolymer in the world. In this work, it is aimed to isolate and characterize chitinase enzyme which can be used in industrial applications.

In the study, chitinase producing microorganisms were isolated by agar diffusion method using colloidal chitin substrate. After the enzyme activity was quantitatively determined by the dinitrosalicylic acid method, the enzyme of the microorganism with the highest chitinase activity was partially purified by the ammonium sulfate precipitation method and its antifungal properties were investigated. Optimum temperature and pH values and stability of enzyme activity, substrate specificity were determined by spectroscopic methods and enzyme kinetics were measured.

The organism that produced the highest zone diameter produced the enzyme chitinase with specific activity of 4.73 U / mg at 30 hours. The enzyme produced shows activity at optimum 30°C and pH 7.0. This microorganism isolated as chitinase producer was identified as *Aeromonas caviae* by 16S rRNA sequence analysis.

2019, 62 Page

**KEYWORDS:** Antifungal, *Aeromonas caviae*, Purification, Kitinase, SDS-PAGE

## ÖNSÖZ

Tez konusunun belirlenmesinden tezin son aşamasına kadar bana yol gösteren, yoğun iş temposu arasında çok değerli vakitlerini ayırarak bana destek olan ve akademik hayatım boyunca bana ışık tutan Tez Danışmanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ'ye teşekkür ederim.

Tezimin başından sonuna kadar desteklerini esirgemeyen, tezimi okuyup düzeltmeleri yapmamda yardımcı olan değerli arkadaşım Hümeysra Aydın'a, tüm hayatım boyunca en büyük desteği ve sevgiyi vererek her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**GÜLESME YILMAZ**  
**26 Ağustos 2019**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGE ve KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Kitinin Genel Özellikleri .....	3
2.1.1. Kitinin kimyasal yapısı .....	3
2.1.2. Kitinin uygulama alanları .....	5
2.2. Kitinazlar- Sınıflandırma .....	5
2.2.1. Amino asit sekanslarına dayanarak kitinazların sınıflandırılması .....	7
2.2.2. Gen dizilerine dayanan kitinazların sınıflandırılması.....	8
2.3. Kitinazın Moleküler Yapısı .....	8
2.4. Kitinazların Dağılımı .....	9
2.5. Kitinin Enzimatik Degradasyonu: Kitinazlar ve Kitin Deasetilazlar.....	11
2.6. Kitinaz Uygulaması .....	12
2.6.1. Fungal protoplast üretimi.....	12
2.6.2. Kitoolisakkarit üretimi.....	12
2.6.3. Böcek kontrolü.....	13
2.6.4. Kitin atıkların yönetimi.....	13
2.7. Antifungal Ajan Olarak Kitinaz.....	13
2.8. Bitkilerdeki Fungal Patojenler .....	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Deneysel Çalışmada Kullanılan Materyaller .....	20
3.1.1. Çalışmada kullanılan aletler.....	20
3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar .....	20



3.1.3. Mikroorganizmaların üretilmesinde kullanılan besiyerleri.....	21
3.1.4. Çalışmada kullanılan organizmalar .....	22
3.1.5. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması .....	23
3.2. Yöntemler .....	29
3.2.1. Toprakta kitinaz üreten suşların izolasyonu .....	29
3.2.2. İzole edilen kitinaz üreticisi bakterinin tanılanması .....	29
3.2.3. Optimum kitinaz enzim aktivite zamanının belirlenmesi .....	31
3.2.4. Antifungal aktivite testleri .....	31
3.2.5. Kitinaz enzim aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesi .....	32
3.2.6. Aktivite ölçümünde enzim miktarının optimizasyonu .....	34
3.2.7. Bradford metodu ile protein miktarı tayini .....	34
3.2.8. Kitinaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu .....	34
4. BULGULAR.....	39
4.1.CHDA (Chitinase-detection agar)'da Kitinaz Üreten Suşların Saptanması	39
4.2. İzole Edilen Kitinaz Üreticisi Bakterilerin Tanınması .....	40
4.2.1. Gram boyama .....	40
4.2.2. Genetik tanılama .....	40
4.3. Antifungal Aktivite Testleri.....	42
4.3.1. Mikroorganizmanın fungal patojenler üzerine etkisi .....	42
4.3.2. Kitinaz enziminin fungal patojenler üzerine etkisi.....	42
4.4. Kitinaz Enziminin Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu..	44
4.4.1. Kitinaz enziminin en yüksek üretiminin yapıldığı zamanın belirlenmesi	44
4.4.2. Aktivite ölçümünde enzim miktarının belirlenmesi .....	45
4.4.3. Bradford metodu ile protein miktarı tayini .....	46
4.4.4. Kitinaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi saflaştırılması ve diyaliz .....	47
4.4.5. Kitinaz enziminin çalıştığı optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi ...	47
4.4.6. Kitinaz enziminin stabilizasyonu .....	48
4.4.7. Kitinaz enziminin çalıştığı optimum pH'ın belirlenmesi .....	49
4.4.8. Farklı substratlarda kitinaz enzim karışımının aktivitesi .....	49
4.4.9. Kitinaz enziminin kitineğinin belirlenmesi.....	50
4.4.10. SDS poliakrilamid jel elektroforezi .....	51
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	53

6. KAYNAKLAR .....	57
7. EKLER.....	60
8. ÖZGEÇMİŞ .....	61



## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
μM	Mikro molar
dk	Dakika
M	Molar
mA	Mili Amper
ml	Mili litre
nm	Nano metre
Rpm	Dakikadaki devir sayısı (rotatory per minute)
μl	Mikro litre

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
APS	Amonyumpersülfat
BSA	Bovine Serum Albümin
ChBD	Kitin bağlayıcı bölge
CHDA	Chitinase-detection agar
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Dithiothreitol
GH	Glikozit hidrolaz
GlcNAc	N-Asetilglukozamin
HCl	Hidroklorikasit
LB	Luria-Bertani
OD	Optik yoğunluk
RNA	Ribonükleik asit
SDS PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TAE	Tris-asetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol

## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kitin monomerini yapısı .....	3
Şekil 2.2. Kitin ve selülozun yapısı .....	4
Şekil 2.3. Kitin ve kitosanın yapısı .....	4
Şekil 2.4. Ekzokitinaz ve endokitinaz aktivitesi .....	6
Şekil 2.5. Kitin degradasyonunun yoluzi .....	11
Şekil 2.6. Fungal hücre duvarından bir kesit .....	14
Şekil 2.7. <i>Fusarium solani</i> 'nin enfekte ettiği domates bitkisi .....	17
Şekil 2.8. <i>Alternaria alternata</i> fungusunun neden olduğu yaprak lekeleri ve elma üzzerindeki kahverengi lekeler .....	18
Şekil 2.9. <i>Botrytis cinerea</i> 'nin enfekte ettiği çilek bitkisi .....	18
Şekil 3.1. Kitinaz enziminin aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan standart eğri grafiği .....	33
Şekil 4.1. CHDA agarda kitinaz üreticisi organizmaların zon oluşturanlardan	39
Şekil 4.2. (a): CHDA agarda kitinaz üreticisi 3 organizmanın oluştuzduğu zonlar (b): CHDA agarda en büyük zonu oluştuzran kitinaz üreticisi 10 numaralı organizmanın oluştuzduğu zon .....	39
Şekil 4.3. Kitinaz üreticisi mikroorganizmanın ışık mikroskobu ile görüntüsü	40
Şekil 4.4. 27F primeri ile oluştuzrulan 16s rRNA dizi analizi kromotogramı ...	41
Şekil 4.5. Dizi sonucu ve soyağacı .....	41
Şekil 4.6. (a): PDA agarda yüzeye herhangi bir işlem uygulanmadan <i>Penicillium</i> fungusunun büyümesi (b): Yüzeyine kitinaz enzimi uygulamış PDA agarda <i>Penicillium</i> fungusunun büyümesi .....	42
Şekil 4.7. PDA agarda <i>Alternaria alternata</i> fungusu üzerinde kitinaz enzimin inhibisyon zonu oluştuzrması .....	43
Şekil 4.8. PDA agarda <i>Fusarium solani</i> fungusu üzerinde kitinaz enzimin inhibisyon zonu oluştuzrması .....	43
Şekil 4.9. PDA agarda <i>Botrytis cinerea</i> fungusu üzerinde kitinaz enzimin inhibisyon zonu oluştuzrması .....	44

Şekil 4.10. Koloidal kitin içeren sıvı besiyerlerinde organizmanın 1. Ve 39. Saat sonrası oluşan renk değişimleri . . . . .	44
Şekil 4.11. Optimum kitinaz enzim üretiminin inkübasyon süresi . . . . .	45
Şekil 4.12. Sabit substrat miktarına karşı optimum enzimin belirlenmesi . . . . .	46
Şekil 4.13. BSA standart eğrisi . . . . .	46
Şekil 4.14. Kitinaz enziminin farklı sıcaklık aralığındaki aktivitesi . . . . .	48
Şekil 4.15. Kitinaz enzimin farklı pH aralığındaki tamponlarda aktivitesi . . . . .	49
Şekil 4.16. Kitinaz enzimin farklı substratlardaki aktivitesi . . . . .	49
Şekil 4.17. Kitinaz enziminin Lineweaver- Burk Grafiği . . . . .	51
Şekil 4.18. Kitinaz enziminin SDS görüntüsü 1.Amonyum sülfat çöktürme sonrası 2.Marker . . . . .	52

## ÇİZELGE LİSTESİ

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 2.1. Farklı canlı organizmalarda kitinazın rolü .....	10
Çizelge 2.2. Kitinazın birtakım kullanım alanları .....	15
Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar .....	20
Çizelge 3.2. LB besiyeri için gereken madde miktarları . .....	21
Çizelge 3.3. CHDA besiyeri için gereken madde miktarları .....	22
Çizelge 3.4. PDA besiyeri için gereken madde miktarları .....	22
Çizelge 3.5. Lügol çözeltisi için gerekli olan madde miktarları .....	23
Çizelge 3.6. Resolveng jel tamponu için gereken madde miktarları .....	25
Çizelge 3.7. Örnek yükleme taponu için gereken madde miktarları . .....	26
Çizelge 3.8. SDS-PAGE jel Boyama çözeltisi için gerekli madde miktarları .27	
Çizelge 3.9. Jelden boyayı geri alma için gerekli olan kimyasallar .....	27
Çizelge 3.10. Yürütme jeli için gerekli olan kimyasallar . .....	28
Çizelge 3.11. Yükleme jeli için gerekli olan kimyasallar .....	28
Çizelge 4.1. Kısmi saflaştırılan kitinaz enziminin saflaştırma profili .....	47
Çizelge 4.2. Kitinaz enziminin farklı sıcaklıklarda stabilizasyonu .....	48
Çizelge 4.3. Lineweaver-Burke grafiği için ham veriler . .....	50

## 1.GİRİŞ

Enzimler, çok çeşitli kimyasal reaksiyonlar gerçekleştiren ve geniş yelpazedeki fizyolojik, analitik ve endüstriyel uygulamalar nedeniyle bilim dünyasının ilgisini çeken biyokatalizörlerdir. Biyoteknolojideki ilerlemeler, özellikle genetik, protein mühendisliği ve dizi verilerinin kullanılabilirliği ile, enzimlerin endüstriyel kullanımı için heyecan verici olanaklar bulunmaktadır. Enzimler, mikrobiyal, hayvansal ve bitkisel kaynaklardan izole edilip, saflaştırılabilirler (Gohel ve ark., 2005). Mikroorganizmalar geniş biyokimyasal çeşitliliği ve genetik manipülasyon kolaylığı nedeniyle yaygın olarak kullanılan enzim kaynağıdır (Zeman ve ark., 2011). Mikrobiyal popülasyonun çeşitliliğine bakıldığında, her zaman ticari uygulamalar için uygun olan, daha iyi özelliklere sahip yeni enzimler üreten mikroorganizmaları bulma şansı vardır.

Kitin, mantar hücre duvarının önemli bir yapısal bileşeni olduğundan, kitinaz üreten mikroorganizmaların, bitkilerin farklı mantar hastalıkları için biyo-kontrol ajanı olarak rapor edildiği bildirilmiştir. Biyolojik kontrol için kitinolitik mikroorganizmaları kullanmak, tarımsal fitopatojenleri kontrol etmek için alternatif bir strateji sunmaktadır (Bai, 2015). Son zamanlarda medikal ve tarımsal uygulamalara sahip olduğu için kitine ilgi yeniden canlanmıştır. Bu yüzden 21. yüzyılın, kitin ve türevleri, kitin metabolizması ve degradasyonu ile ilgili enzimler için “yeni bir dönem” oluşturduğu görülmektedir (Chanpen ve ark., 1999).

Günümüzde kitinazlar, fungal protoplastların izolasyonu, sivrisinek kontrolü, kitin içeren böceklerin parçalanması, tek hücre proteininin üretimi, oligosakkaritlerin ve N-asetil glukozaminin hazırlanmasında gibi uygulamalar nedeniyle daha fazla ilgi görmüştür. Atık yönetimi, ilaç, biyoteknoloji ve biyokontrolde birçok uygulamasından dolayı kitinazın önemi artmıştır. Deniz ortamları çok sayıda kitin atığı içerdiğinden, bu ortamlarda yüksek verimli kitinaz üreticilerinin bulunması mümkündür. Bu tür organizmalar ayrıca kıyı ortamlarında da bulunmaktadır (Bai, 2015).

Bu tez çalışmasında doğal ortamlardan (özellikle kitin içeren nehir kenarından), kitinaz üretme yeteneğinde olan mikroorganizmaların, saf kültürlerinin hazırlanması,

izolasyonu, en yüksek kitinaz üretme yeteneğinde olan suştan üretilecek kitinaz enziminin karakterizasyonu yapmak amaçlanmıştır. Enzim karakterizasyonu için; optimum pH, sıcaklık stabilite, optimum sıcaklık tayinleri, SDS-PAGE’de enzimin boyutunun tespiti ve farklı fungal patojenler üzerindeki etkileri araştırılmıştır.





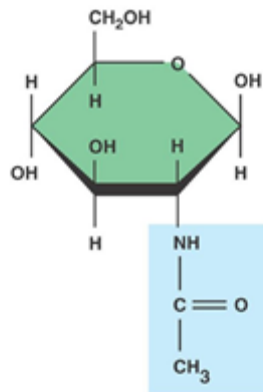
## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Kitinin Genel Özellikleri

Kitin, N-asetil-D-glukozaminin bir polimeridir. 1811'de kitin, ilk kez Fransız kimyacı H. Broconnot tarafından tanımlanmıştır. Kitin kelimesi, bir dereceye kadar işlevini açıklayan Yunanca “zırh” sözcüğünden kaynaklanır. Gezegendeki ikinci en bol bulunan biyopolimerdir. Kitin, böceklerin, mantarların, mayaların, yosunların, yengeçlerin, karideslerin ve ıstakozların dış iskeletinde ve diğer omurgasızların içyapılarında bulunur. Kitin beyaz, sert, elastik olmayan bir polisakkarittir ve kıyı bölgelerinde kirliliğe neden olur. Karasal ekosistemlerdeki kitinin çoğunu mantar oluşturmaktadır. Hem eklem bacaklıların hem de mantarların topraktaki kitin kütlesine katkısı oldukça yüksektir. Ayrıca, *Streptomyces* ve *Actinobacteria* gibi bazı bakterilerin de dış kılıfında kitin içerebileceği düşünülmektedir. Prokaryotlar, bitkiler ve omurgalılar da dahil olmak üzere diğer organizmaların yapıları içinde kitin yoktur (Eldin, 2009).

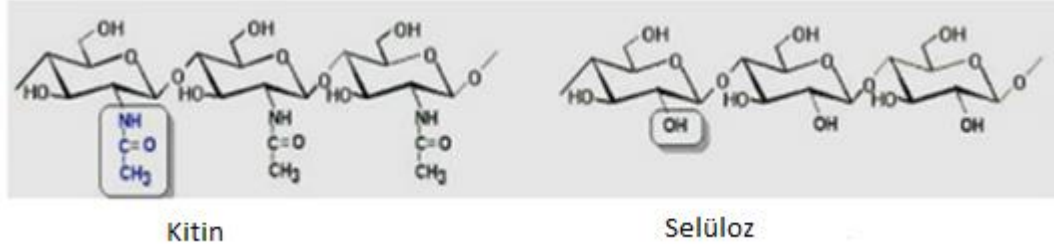
#### 2.1.1. Kitinin kimyasal yapısı

Kimyasal olarak, kitin  $\beta$ -(1,4)-N-asetil-D-glikoz-2-amin'in dallanmamış zincirlerinin bir homopolimeridir. Şekil 2.1'de şekilde kitinin monomer yapısı gösterilmiştir.



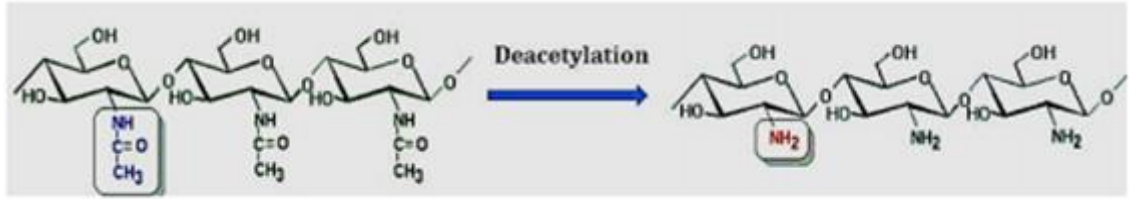
Şekil 2.1. Kitin monomerini yapısı

Kitin ve selüloz benzer bir yapıya sahiptir. Ancak, kitinin yapısında asetilasyona uğramış amino grupları, selülozda hidroksil grupları bulunmaktadır (Saber, 2015). Şekil 2.2.'de kitin ve selülozun yapılarındaki farklılıklar gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Kitin ve selülozun yapısı

Saf kitin tamamen asetile edilir ve nadiren doğada bulunur. Doğal kitin kısmen asetillenir, matriksinin bazı kısımları nispeten asetil içermez (tamamen asetillenmiş kitin kitosan olarak adlandırılır). Doğal örneklerde (öncelikle deniz organizmalarında), asetilasyon derecesi tipik olarak % 80-95'tir. Kitin ve deasetilatlı formu kitosan arasında ayırım Şekil 2.3'te görülmektedir. Kitin, doğada her zaman glukanlar, lipitler veya proteinler gibi diğer moleküller ile birlikte bulunur (Saber ve ark., 2015).



Şekil 2.3. Kitin ve kitosanın yapısı

Kitin önemli özellikleri; suda çözünmezliği, asit, alkali ve birçok organik çözücülere olan direncidir. Kitosan, kitin-oligosakkarit, D-glukozamid, D-glukozamid hidroklorür ve GlcNAc gibi ürünler için temel hammaddedir. Kitin kristal bir yapıya sahiptir ve organize liflerden oluşan bir ağ oluşturur. Bu yapı, onu içeren organizmalara, saldırıya karşı sertlik ve direnç kazandırır. X-ışını kırınım çalışmaları, mikro-fibrillerin yöneliminde farklı olan üç polimorfik kitin formunu ortaya çıkarmıştır:  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ -kitin. Bu üç form temel olarak hidrasyon derecesi, N-asetilglukosamin tekrarlayan birimlerin sayısı ve birim başına zincirlerin oryantasyonu bakımından farklıdır (Liu ve ark., 2018). En yaygın biçim, polimer zincirlerinin antiparalel düzenlemede olduğu  $\alpha$ -kitin'dir. Daha az yaygın olan diğer iki form, polimer zincirlerinin paralel dizilişte olduğu  $\beta$  kitin, karışık paralel ve antiparalel dizilişlerin olduğu  $\gamma$ -kitin'dir.  $\gamma$ -kitin az rastlanır ve ara

form olduğu düşünölmektedir. Kabuklular çoğunlukla  $\alpha$  -kitin içerir,  $\beta$ -kitin fungal hücre duvarlarında bulunurken, mürekkep balığı  $\gamma$  - kitin içerir (Gohel ve ark., 2005).

### 2.1.2. Kitinin uygulama alanları

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. Kitin ve kitosan biyobozunur, toksik olmayan ve biyo-uyumlu malzemelerdir. Her iki malzeme de nispeten düşük maliyetle doğal kaynaklardan üretilebilir. Ayrıca, kitin polimerinin fizikokimyasal özellikleri, yapısal modifikasyonlara ve farklı formların oluşturulmasına izin verir.

- Kromatografik yöntemlerde, enzim ve tüm hücre immobilizasyonunda biyoteknolojide kullanılır.
- Kıvamlaştırıcı, koruyucu, hayvan yemlerinde katkı maddesi, hipokolesterolemik madde (zayıflama maddesi), atık yiyeceklerin tekrar işlenmesi, meyve sularının arıtılmasında, sütlerinin işlenmesinde gibi gıda endüstrisinde,
- Bir başka önemli uygulama da tarımda olup, bitki tohumu kaplanmasında kullanılmaktadır.
- Kitin filmleri veya lifleri, tıbbi ve farmasötik uygulamalarda, yara örtü maddeleri ve kontrollü ilaç salma maddeleri olarak, kırıldak replasmanında büyüme için iskeleler ve rejeneratif tıpta mezenkimal kök hücreler için destek olarak kullanılır. Ayrıca, ilaç dağıtımı için nanopartiküller olarak da kullanılabilirler. Kan pıhtılaştırıcı olarak, hidroksiapatit ve kitosan ile birlikte kemik dolgu malzemesi olarak, kontakt lens yapımında kullanılmaktadır.
- Sanayide, farklı organik moleküllerin geri kazanımı, su arıtımı ve endüstriyel atıklardan metallerin uzaklaştırılmasında kullanılabilir (Zarei ve ark., 2011).

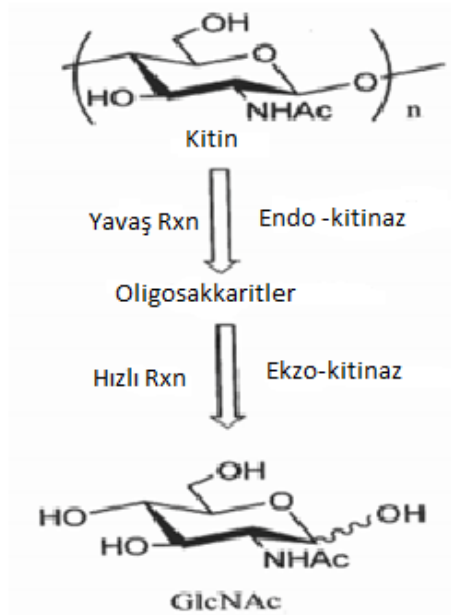
### 2.2. Kitinazlar - Sınıflandırma

Kitin, N-asetil-glukozamin (GlcNAc) 'den oluşan yüksek ölçüde çözünmez  $\beta$ -(1,4) bağlı polimerdir. Kitinazlar kitini oligomerik, dimerik ve monomerik bileşenlerine hidrolize edebilen enzimlerdir. Kitinazlar doğada, bakteri, mantar, bitki, böcek, protozoa, insan

ve mayaları içeren geniş bir dağılıma sahiptir. Bu organizmalardaki kitinazların rolleri çeşitlidir. Bakterilerde kitinazlar, genellikle beslenme ve parazit mineralizasyonunda rol oynarlar. Fungal kitinazlar, hücre bölünmesinde ve farklılaşmasında fizyolojik rol oynarlar. Bitkilerde kitinazlar, fungal patojenlere karşı bitki savunma mekanizmalarının bir parçasıdır. Böceklerde, gelişimleri sırasında deri değiştirme sürecine dahil olduğu bulunmuştur. Kitinazların ayrıca insan mide sularında da olduğu görülmüştür (Basu ve ark., 2013).

Kitin enzimatik hidrolizi bir kitinolitik sistem tarafından gerçekleştirilir. Bu iki ana kategoride sınıflandırılabilir: ekzokitinazlar ve endokitinazlar. Endokitinazlar, düşük yoğunluklu N-asetilglukosamin (NAG) multimerleri üreten, iç bölgeler üzerinde rastgele ayrılırlar. Şekil 2.4.'te endo ve ekzokitinazların aktivitesi gösterilmiştir. Ekzokitinazlar 2 alt kategoriye ayrılırlar; B(1,4)-N-asetil-glukozaminidazlar (NAGase) ve kitobiosidazlar.

1.  $\beta$ -(1,4)-N-asetil-glukozaminidazlar: N-asetilglukozamin oligomerlerinden monomer birim olan N-asetilglukosaminleri oluştururlar.
2. Kitobiosidazlar: Kitin monofibrinin indirgeyici olmayan ucundan diasetil kitobiyozun salınmasını katalize ederler (Gupta ve ark., 2017).



Şekil 2.4. Ekzokitinaz ve endokitinaz aktivitesi (Gupta ve ark., 2017)

### 2.2.1. Amino asit sekanslarına dayanarak kitinazların sınıflandırılması

Kitinazlar geniş bir moleküler ağırlık aralığı (MW) (20-115 kDa), optimal çalışma sıcaklığı (18-90°C), pH değerleri (2-10.5) ve pI değerleri (3.5-8) olan glikoproteinlerdir. Toplu olarak kitinazlar farklı ailelere bölünen glikozil hidrolaz (GH) grubuna aittir. Kitinazların çoğu 18, 19 ve 20 GH ailelerinde bulunmuştur. Bu GH aileleri evrimsel açıdan farklıdır ve spesifik bir kitinolitik aktiviteye sahip enzimlerdir ve yüksek substrat özelliklerine sahip olan enzimleri içerir. Her ne kadar 18 ve 19 ailelerinden gelen kitinazlar sıklıkla aynı kaynaktan izole edilmiş olsa da, geniş amino asit dizisi benzerliğini paylaşmazlar. Ayrıca, tamamen farklı üç boyutlu yapılara ve farklı katalitik moleküler mekanizmalara sahiptirler ve bu nedenle farklı atalardan evrimleşmiş olmaları muhtemeldir. Bu aileler, birincil yapı karşılaştırmasına göre gruplandırılmıştır ve aynı aileye ait olan enzimlerin, katalitik alanın katlanması, substrat spesifitesi ve reaksiyonun stereokimyası açısından birkaç ortak özelliği paylaştığı bilinmektedir. Üç boyutlu yapıdaki farklılığa ek olarak, iki aileye ait kitinazlar (18 ve 19) biyokimyasal özelliklerinde önemli farklılıklar göstermektedir (Severgnini, 2006).

GH18, bakteri, mantar, virüs, hayvan ve bazı bitkilerden kitinaz içerir. GH19, bitki ve bazı bakteri (*Streptomyces*) kitinazı içerir. Aile 20, bakteri ve insanlardan  $\beta$ -N-asetil heksosaminidaz içerir. GH18 kitinazın katalitik domainleri, sekiz  $\alpha$ -helis ve sekiz  $\beta$ -iplikten oluşan bir TIM barrel domaine sahiptir. GH19 kitinaz ailesinin katalitik alanları, yüksek  $\alpha$  heliks içeriğe sahiptir ve kitosanaz ve lizozim ile korunmuş bir çekirdek içeren yapısal benzerliğe sahiptir. GH18 aileye ait olan kitinazlar için karakteristik olan substrat destekli kataliz, ürünün anomerik karbonunda konformasyonun tutulmasına yol açar. Asit katalizör mekanizmasını kullanarak GH19 ailesinden kitinazlar tarafından gerçekleştirilen hidrolizin reaksiyonu, anomerik konfigürasyonu tersine çevirir (Ingunn ve ark., 2013).

Aile 18 kitinazlar, kitinaz inhibitörü olarak bilinen *Streptomyces*'in tipik bir sekonder metaboliti olan allosamidine karşı duyarlıdır. Bitkilerden aile19 kitinazların allosamidine duyarsız olduğu gösterilmiştir. Aile 18 kitinazlar, GlcNAc-GlcNAc ve GlcNAc-GlcN bağlarını hidrolize ederken, aile 19 kitinazlar, GlcNAc-GlcNAc ve

GlcN-GlcNAc bağlarını hidrolize eder. Substrat destekli kataliz, GH18 kitinazın katalitik mekanizması için en yaygın kabul gören model iken, genel bir asit baz mekanizmasının GH19 kitinaz aileleri için katalitik mekanizma olduğu ileri sürülmüştür. Kitinaz 20 ailesi için detaylı bilgiler bulunmamaktadır. Aile 18 kitinazlar, bireysel katalitik alanların amino asit dizisine dayalı olarak, A, B ve C olarak 3 ana alt aileye sınıflandırılabilir. A kitinaz alt ailesi, yedinci ve sekizinci ( $\alpha / \beta$ ) barrel arasında bir  $\alpha + \beta$  katlanma bölgesinin sokulmasına karşılık gelen üçüncü bir alana sahiptir, oysa B ve C alt familyasına ait olan kitinazlar bu bölgeye sahip değildir. *Serratia marcescens* gibi çeşitli bakterilerde farklı alt aileler bulunmaktadır (Zarei ve ark., 2011).

### **2.2.2. Gen dizilerine dayanan kitinazların sınıflandırılması**

Bilinen kitinaz gen dizilerine dayanarak, Perrakis ve arkadaşları (1994), 19 ve 18 ailelerini iki ayrı sınıfa gruplandırırken, Iseli ve arkadaşları (1996), ise kitinazları altı sınıfa ayırmışlardır. Kitinaz sınıfını belirleyen karakteristik özellikler: N terminal dizisi, enzimin lokalizasyonu, izoelektrik pH, sinyal peptidi ve indükleyiciler. Sınıf I kitinazlar sistein açısından zengin N terminali, lösin veya valince zengin sinyal peptidi ve vakuolar lokalizasyonudur. Aynı zamanda, kitinlerin bazik ve asidik yapısına dayanarak alt Sınıf Ia ve Ib olarak alt bölümlere ayrılmıştır. Sınıf I kitinazlar bitkilerde bulunurken, Sınıf II enzimleri de bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde bulunur. Sistein açısından zengin N-terminal bölgesinden yoksundurlar, ancak Sınıf I kitinazlarla sekans benzerliğine sahiptirler. Sınıf I kitinazların çoğu endo-kitinazlar ve Sınıf II kitinazlar ekzo-etkiye sahiptir. Sınıf III kitinazlar, Sınıf I veya II'nin enzimlerine sekans benzerliğine sahip değildir. Sınıf IV kitinazlar, Sınıf I kitinazlar gibi immünolojik özelliklere sahiptirler, fakat bunlar Sınıf I kitinazlardan daha küçüktürler (Iseli ve ark., 1996).

### **2.3. Kitinazın Moleküler Yapısı**

Kuranda ve Robbins (1991)'e, göre kitinaz, bir sinyal dizisi, bir katalitik alan, bir serin/treonin açısından zengin bölge ve bir C-terminal kitin bağlayıcı alan olmak üzere

dört alan içerir. Bu serin/treonin açısından zengin bölge O-glikozilasyon için bir alıcı bölge olarak işlev görür (Kurandave ark., 1991).

Bakteriyel kitinazlar, genellikle katalitik domaine bağlı olarak kitin bağlayıcı bölgeler (ChBD'ler) ve fibronektin tip III-benzeri bölgeler (Fn3 alanları) gibi çoklu fonksiyonel alanlardan oluşur. ChBD'nin kitin degradasyonundaki önemi, bazı bakteriyel kitinazlarda gösterilmiştir. Watanabe ve arkadaşları (1993), *Bacillus circulans* (A1, A2, B1, B2, C ve D) tarafından salgılanan altı farklı kitinaz rapor etmişlerdir. Bunlar arasında, en bol miktarda üretilen kitinaz A1, kitine güçlü bir afinite göstermiştir. ChiA1 geni ve ChiD geni daha fazla incelenmiştir. Watanabe ve arkadaşlarına göre, ChiA1 kitinaz C terminalinde bir kitin bağlama alanına sahiptir ve N-terminal alanı, enzimin katalitik bölgesini içermektedir. Üçüncü fonksiyonel alan, ekzo-hidrolitik mekanizmaya dahil olabilen fibronektin tip III alanıdır (Watanabe ve ark., 1999).

#### **2.4. Kitinazların Dağılımı**

Kitinazlar mikroorganizmalarda, bitki böceklerinde, nematodlarda ve hayvanlarda görülür. Bu organizmalardaki kitinazların fizyolojik ve ekolojik rolü Çizelge 2.1.'de listelenmiştir. Bir mikrobiyal topluluğun kitin indirgeme yeteneği, topraktaki azotun geri dönüşümü için de önemlidir. *Serratia marcescens*, *Xanthomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Paenibacillus illinoisensis* vb. bakteriler, güçlü kitinolitik bakteriyel biyokontrol ajanları olarak ispatlanmış, *Myrothecium verrucaria* ve *Trichoderma sp.* gibi mantarlar arasında ana kaynak olarak bulunmuştur. Böceklerde ve nematodlarda gelişimleri sırasında üreme sürecine dahil olduğu bulunmuştur. Kitinazlar ayrıca mide sularında ve insan serumlarında bulunduğu bildirilmiştir. Bitkilerde kitinolitik aktivite gösteren bir dizi protein tespit edilmiştir. Bu proteinler, apoplast ve vakuoller dahil tüm bitki dokularından izole edilmiştir. Bitkilerde bu enzimler moleküler yapı ve substrat spesifitesinde de farklılık gösteren büyük ve farklı bir grubu temsil etmektedirler (Cody, 1989). Çizelge 2.1'de kitinaz enziminin farklı canlılardaki rolleri kısaca özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Farklı canlı organizmalarda kitinazın rolü ( Mandana ve ark., 2011)

<b>Canlı Organizma</b>	<b>Kitinaz Enziminin Rolü</b>
Virüs	Baculovirüsler, zararlı haşeratların biyolojik kontrolünde aynı zamanda patojenez için kitinaz üretiminde rol alırlar.
Bakteri	Kitinin mineralizasyonu ve parazitlerle mücadelede etkindir.
Mantar	Hücre bölünmesi, farklılaşması ve beslenmesindeki rolü mikoparazitik aktivite ile ilişkilidir.
Bitki	Mantar büyümesini baskılar. Spesifik izoformlar embriyo gelişiminde rol alabilir. Tohum gelişim aşamalarında, tozlaşma ve meyve olgunlaşma sürecinde etkilidir.
Böcek	Farklı larva seviyelerinde kutikül degradasyon prosesinin gelişiminde önemlidirler.
Protozoa	Sıtma parazitleri kitin içeren sivrisinek mide matriksine nüfuz etmek için yeterli miktarda kitinaz üretir.
İnsan	Kitotriozidaz aktivitesi nematodlara karşı savunmada yardımcı olur. Kitotriozidaz lizozomal bir hastalık olan Gaucher hastalığının belirtecidir.
Hayvan	Keçi ve sığır kanındaki yüksek kitinaz seviyesi, düzgün gerçekleşmeyen lizozim üretimi durumunda enzim seviyesini nispeten düşük tutan böbrek faaliyetlerinin yavaşlamasının bir fonksiyonu olabilir.
Maya	Kitinazlar <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin tomurcuklanma sürecinde hücre bölünmesi üzerinde önemli bir role sahiptir.

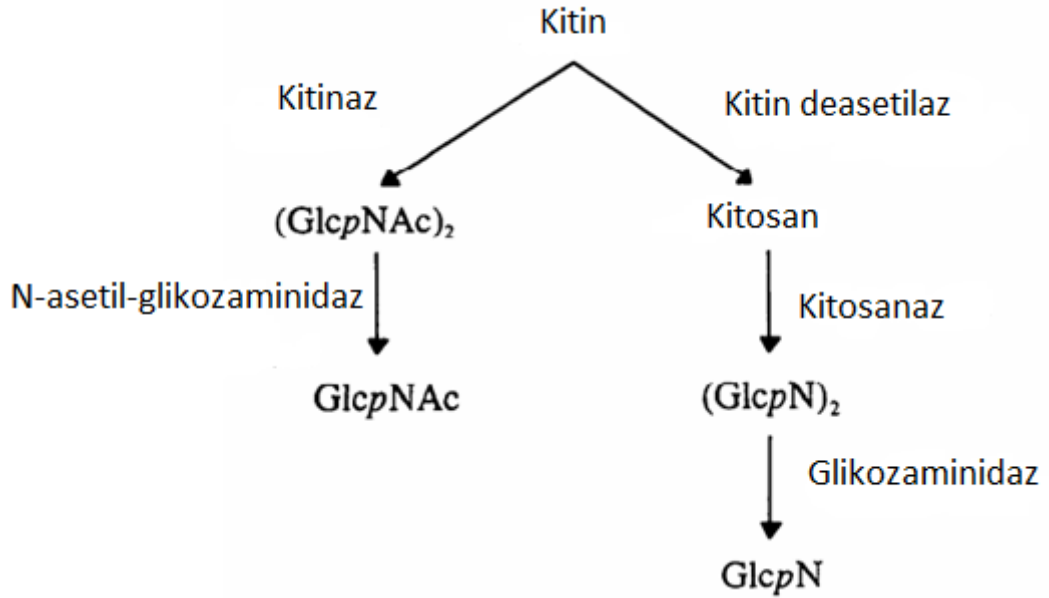
Kitinolitik enzim üreten bakteriler, kabuklular ve böceklerin dış iskeleti gibi kitlesel materyallerin geri dönüşüm sürecinde kritik bir rol oynar. Kitinin çözünmeyen formu, biyolojik olarak kullanılabilir bir formda ekosisteme geri gönderilmezse kısa bir sürede deniz ortamında karbon ve azot kaynağı tükenebilir.



## 2.5. Kitinin Enzimatik Degradasyonu: Kitinazlar ve Kitin Deasetilazlar

Kitin polisakaritleri doğal sistemlerde çok büyük miktarlarda üretilmesine rağmen çevrede birikmezler. Serbest bırakılan enzimler tarafından bozunmalarının ana mekanizması iyi bilinmektedir. Şekil 2.5.'te kitin degradasyonunun yolizi gösterilmiştir. Kitin enzimatik dönüşümü iki ana yoldan meydana gelebilir:

- 1- (1-4) - $\beta$ -glikozidik bağların hidrolizi - kitinolitik süreç
- 2- Deasetilasyon



Şekil 2.5. Kitin degradasyonunun yolizi

Birinci yolda,  $\beta$ -1,4-glikozidik bağının kitinaz ile indüklenen hidrolizi, bu süreç kitinolitik mekanizma olarak adlandırılır. İkinci yolda, polimer önce deasetilasyondan geçirilir ve bundan sonra kitosanazlar tarafından hidrolize edilir. Bu yol, özellikle kitosanın önemli bir organik bileşen olduğu nehir ortamlarında önemlidir (Kankanamge, 2017).

Kitin degradasyonu esas olarak mikroorganizmalar tarafından yapılır, ancak bitkilerde, omurgasızlarda ve omurgalılarda kitinolitik enzimler bulunur. Kitinaz genellikle omurgalı hayvanların sindirim sisteminde bulunur, omurgasızlar ise eski kutikülleri parçalamak için kitinazlara ihtiyaç duyarlar. Bitkilerdeki kitinazlar, mikrobiyal

enfeksiyona veya mantar hücresi duvarındaki kitin oligosakkaritlerine karşı bir savunma yanıtı olarak üretilen indüklenebilir enzimlerdir. Fungal kitinazların otolitik, besleyici ve morfogenetik rolleri olduğu düşünülürken, bakteriyel kitinazlar esas olarak karbon, azot ve enerji elde etmek için salgılanır ( Yuli ve ark., 2004).

## **2.6. Kitinaz Uygulaması**

### **2.6.1. Fungal protoplast üretimi**

Fungal protoplast, strain gelişiminin yanı sıra hücre duvarı sentezi, enzim sentezi ve sekresyonunun araştırılmasında kullanılabilir. Dahiya ve arkadaşları (2005), *Trichoderma reesei*, *Pleurotus florida*, *Agaricus bisporus* ve *A. niger*'den protoplast üretiminde *Enterobacter sp.* NRG4 kitinazın etkinliğini araştırmışlardır. Ayrıca, filamentli mantarlar kullanılarak üretilen elde edilen protoplastlar olduğunu da bildirmişlerdir (Dahiya ve ark., 2005).

*Paecilomyces varioti*'den elde edilen kitinaz, bir termofilik mantar olan *Malbranchea sulfurea*'nın protoplazmalarını izole etmek için kullanılmıştır. *Cellulosimicrobium cellulans* strain 191'den elde edilen kitinaz, protoplast oluşumuna yol açan bazı mantarların hücre duvarlarını liziz edebilir (Wang ve ark., 2002).

### **2.6.2. Kitoolisakkarit üretimi**

Kitoolisakkaritler ve N-asetile edilmiş analogları, antimikrobiyal aktivite, antitümör aktivitesi, immüno yanıt arttırıcı etkiler gibi biyolojik aktiviteleri olduğu için çeşitli alanlarda kullanılabilir. Kitotrioz, *Bacillus subtilis*'in enzimi kullanıldığında koloidal kitin kaynaklı en büyük enzimatik hidrolizat oluşturulmuştur. Kitinaz, koloidal kitinden kitopentoz ve kitotrioz hazırlamak için kullanılmıştır. Çeşitli endo-kitinazların transglikosilasyon aktivitesi, değişen glikozidik bağları ile istenen kitooligomerleri üretmek için de yararlı olacaktır. *Trichoderma reesei* ve *Nocardia orientalis*'in kitinazları da etkili transglikosilasyon reaksiyonu göstermiştir (Verma ve ark., 2007).

### 2.6.3. Böcek kontrolü

Birçok hastalık sivrisinekler tarafından yayılır. Mendonsa ve arkadaşları (1996) *Myrothecium verrucaria*'dan kitinaz içeren ham özü kullanarak bir sivrisinek olan *Aedes aegypti*'nin I ve IV instar larvalarını öldürmüştür. I ve IV instar larvaları için saflaştırılmış endokitinazin öldürücü süresi sırasıyla 48 saat ve 120 saattir. Saflaştırılmış kitinaz lipolitik enzimle verildiği zaman süresi 24 saat ve 48 saate düşmüştür. (Mendonsa ve ark., 1996).

### 2.6.4. Kitin atıkların yönetimi

1993 yılında, deniz omurgasızlarının işlenmesinden elde edilen yıllık dünya çapındaki toplam kitin atıkları 37.000 ton iken 2000 yılında 80.000 tona yükselmiştir. Geleneksel olarak, çöp atıkları ya yakılarak ya da arazi dolgusuyla bertaraf edilir, fakat bu yöntemler çevreye zarar verir, çünkü yanma çevreye karbondioksit ve karbon monoksit açığa çıkarır küresel ısınmaya neden olur. Bozunma çok yavaş olduğundan ve son üründen biri yeraltı sularının etkili bir kirleticisi olan amonyak olduğundan, arazi doldurma da zararlıdır. Kitin, katı atık maddelerden güçlü asit veya baz içeren kimyasal yöntemler vasıtasıyla geri kazanılabilir. Kimyasal işlemler de atık bertarafı problemleri yaratır, çünkü boşaltılan atık suyun nötralizasyonu ve detoksifikasyonu gereklidir (Rattanakit ve ark., 2002).

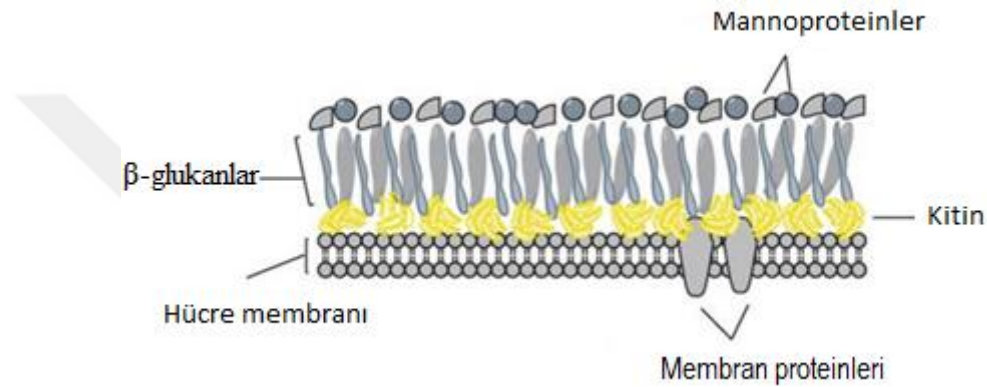
### 2.7. Antifungal Ajan Olarak Kitinaz

Mantar türlerinin hepsi hücre duvarlarına sahip değildir. Hücre duvarına sahip olanlarda üç tabaka vardır, Şekil 2.8.'de fungal hücre duvarından bir kesit gösterilmiştir ve içten dışa doğru bunlar:

- Bir kitin tabakası: çoğunlukla dallanmamış N-asetil-D-glukosamin zincirlerinden oluşan polimer.
- Bir  $\beta$ -1,3-glukan tabakası (zimosan): Kitin veya kitosan polimerlerini çapraz bağlamaya yarayan glikoz polimerleri.  $\beta$ -glukanlar  $\beta$ - (1,3) - veya  $\beta$ - (1,6) - bağlarla

bağlanmış glikoz molekülleridir ve  $\alpha$ -glukanlar  $\alpha$ -(1,3) ve  $\alpha$ -(1,4) bağları ile tanımlanır ve matrisin bir parçası olarak işlev görür, hücre duvarına sertlik sağlarlar.

• Proteinler: Hücrenin dışında ağır glikozillenmiş olan mannoproteinlerin (mannoz içeren glikoproteinler) tabakasıdır. Yapısal proteinlere ek olarak hücre duvarı sentezi ve lizisi için gerekli olan enzimlerin hepsi hücre duvarında bulunur. Hücre duvarında bulunan yapısal proteinlerin çoğu glikozillenmiştir ve mannoz içerir. Bundan dolayı bu proteinlere mannoproteinler veya mannanlar denir (Shubakov ve ark., 2004).



Şekil 2.6. Fungal hücre duvarından bir kesit (Shubakov ve ark., 2004)

Fungal hücre duvarları, plazma membranının dışında bulunur ve mantar hücrelerini çevreler. Plazma membranı tarafından sabitlenen kitin, hücre duvarının en büyük bileşenidir. Bir tür polisakkarit olan glukanlar, hücre duvarı sertliğini sağlar. Proteinler, bazı mannanlar, fungal hücre duvarında bulunur ve hücre duvarının daha fazlasını sentezlemek için enzimler olarak çalışırlar. Hücre duvarındaki kitin, bilim adamlarına bitki, bakteri ve protist hücrelerinden mantar hücrelerini ayırmalarına yardımcı olur (Roberts ve ark., 1988).

Fungal hücre duvarı, mayalarda hücre genişmesi ve bölünmesi sırasında ve spor çimlenmesi sırasında, filamentöz mantarlarda hif dallanması ve septum oluşumu gibi sürekli değişime maruz kalan oldukça dinamik bir yapıdır. Kitinazın birçok uygulama alanı vardır, Çizelge 2.2.'de kısaca özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Kitinazın birtakım kullanım alanları (Hamid ve ark., 2013)

<b>Kullanım Alanı</b>	<b>Uygulama</b>
Biyolojik araştırmalar	-Mantar protoplastlarının izolasyonu -Morfogenez alışmaları -Hücre duvarı sentezi -Enzim sentezi ve sekresyonu -Mantar biyokütlesinin tahmini
Biyokontrol ajanı olarak kullanımı	-Bitkilerde bulunan mantar kökenli patojenlerin büyümesinin inhibisyonu -Sivrisinek larvalarının öldürülmesi ile sivrisinek kontrolünün sağlanması -Zararlı haşerelere karşı biyopestisit
Balık atıklarının degradasyonu	-Atıkların değerli son ürünlere biyolojik olarak dönüşümü -Kitoooligosakkaridler insanlar üzerinde etkili ilaçlarda potansiyel olarak kullanışlıdır. -Tek hücre proteini -Kimyasal ve farmasötik ara ürünler için glukozamin ve tatlandırıcılar ve büyüme faktörleri gibi gıda ürünleri
Medikal uygulamalar	-Mantar kökenli hastalıkların tedavisi

Günümüzde kitinazlar, fungal protoplastların izolasyonu, sivrisinek kontrolü, kitin içeren böceklerin parçalanması, tek hücre proteininin üretimi, oligosakkaritlerin ve N-asetil glukozaminin hazırlanmasında gibi uygulamalar nedeniyle daha fazla ilgi görmüştür. Atık yönetimi, ilaç, biyoteknoloji ve biyokontrolde birçok uygulamasından dolayı kitinazın önemi artmıştır. Deniz ortamları çok sayıda kitin atığı içerdiğinden, bu ortamlarda yüksek verimli kitinaz üreticilerinin bulunması mümkündür. Bu tür organizmalar ayrıca kıyı ortamlarında da bulunmaktadır. Kitin, mantar hücre duvarının önemli bir yapısal bileşeni olduğundan, kitinaz üreten mikroorganizmaların,

bitkilerin farklı mantar hastalıkları için biyo-kontrol ajanı olarak rapor edildiği bildirilmiştir. Biyolojik kontrol için kitinolitik mikroorganizmaları kullanmak, tarımsal fitopatojenleri kontrol etmek için alternatif bir strateji sunar (Brzezinska ve ark., 2013).

## **2.8. Bitkilerdeki Fungal Patojenler**

Fungal patojenler, tohum kuvvetini azalttıkları ve bitkinin büyüme aşamalarında zayıflattığı için zararlıdır. Mantarların neden olduğu tohum kaynaklı hastalıklar, mantar hiflerinin yerleşmesi ve uyku haline gelmesinden dolayı kontrol edilmesi zordur. Eğer enfekte veya kontamine olmuş tohum, kontamine olmayan toprakta ekilirse, patojen bu toprakta çoğalabilir. Tohum kaynaklı patojenlerin yanı sıra, mantarlar depolama ürünleri üzerinde de büyüebilir. Bu mantarlar, tohum çimlenebilirliğini azaltabilir, tohumun renginin bozulmasına neden olabilir, insan ve evcil hayvanlara zararlı olabilecek toksinler üretebilir ve tohum ağırlığını azaltabilir. Tohumları, hastalıklara karşı korumak için kimyasal fungusitler ve böcek ilaçları yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bunların kullanımı son derece toksik olduğundan, endişe vericidir. Gıda ürünlerinde böcek ilacı kalıntılarının bulundurulabilmesi ve çevresel kontaminasyona neden olabilir veya patojen direncini artırır (Neergaard ve ark., 2003). Bitki fungal patojenlerinden bazıları aşağıda verilmiştir.

*Aspergillus niger*: Küf hastalığı ya da siyah çürüklük olarak bilinir. Birçok sebze ve meyvede hastalığa neden olur. Toprak ve ürün atıklarında görülebildiği gibi tohum kökeninde de olabilir bu fungal etmen. Özellikle depolarda saklanan soğan gibi bitkilerde büyük hasara yol açmaktadır (Person ve ark., 2010).

Kitinaz genini eksprese eden transgenik bitkilerin üretimi de patojenlere karşı dirençli olduğu gösterilmiştir. Vaidya ve arkadaşları (2001), transgenik tütün bitkilerinde *A. niger* 'e karşı direnç oluştuğunu belirtmişlerdir. Ayrıca iki bakteriyel kitinaz geninin yüksek seviyelerde eksprese edildiği transgenik tütün bitkilerinde *A. niger* enfeksiyonunun oluşumundaki azalmayı doğrulamışlardır (Vaidya ve ark., 2001).

*Fusarium solani*: Fungal bir hastalık etmeni olup, uzun yıllar toprakta canlılığını koruyabilir ve bitkilerin sadece direkt olarak köklerini etkilemektedir. Böyle etkilenen bitkilerin toprak üstü aksamalarında genel bir solgunluk ve sararma da görülebilir. Enfeksiyonun hafif olduğu zamanlar bitkiler ölmekte ve hasata kadar canlılığını korumaktadır (Berkem ve ark., 2016). Şekil 2.7.'de *F. solani*'nin enfekte ettiği domates bitkisi gösterilmiştir.



Şekil 2.7. *F. solani*'nin enfekte ettiği domates bitkisi (Berkem ve ark., 2016)

Chang ve arkadaşları (2010), *Bacillus cereus*' den alınan kitinazın *F. oxysporum*, *F. solani* ve *Pythium ultimum* gibi bitki patojenik mantarlarının büyümesini engellediğini bildirmişlerdir (Chang ve ark., 2010).

*Alternaria alternata* (kahverengi leke hastalığı): 380'den fazla konukçu bitki türünde yaprak lekeleri ve diğer hastalıklara neden olan bir mantardır. Birçok bitki parçasında yaprak lekelerine, çürümelere ve yanıklara neden olan sayısız konukçuda fırsatçı bir patojendir (Salo ve ark., 2007). Şekil 2.8.'de *A. alternata* fungusunun neden olduğu yaprak lekeleri ve elma üzerindeki kahverengi lekeler görülmektedir.



Şekil 2.8. *A. alternata* fungusunun neden olduğu yaprak lekeleri ve elma üzerindeki kahverengi lekeler (Salo ve ark., 2007)

*Botrytis cinerea*: Her yerde ve çok yaygın olarak bulunan bir fungus olup, birçok bitkiye saldırma ve koloni oluşturma yeteneğindedir. Bitkilere gelişmesi için ideal bir beslenme yeri oluşturan yaralı kısımlardan ya da dokulardan giriş yaparlar. Konukçu bitkileri arasında domates ile ekim nöbetine giren veya domatesin yakın çevresinde yaygın biçimde yetiştirilen marul, fasulye, salata, biber, patlıcan, çilek gibi bitkilerdir (Williamson ve ark., 2007). Şekil 2.9.'da *B. cinerea*'nın enfekte ettiği çilek bitkisi gösterilmiştir.



Şekil 2.9. *Botrytis cinerea*'nın enfekte ettiği çilek bitkisi (Williamson ve ark., 2007).

Roberts ve arkadaşlarının (1988), yaptıkları çalışmalarda, *B. cinerea* (Tütün Yanığı), *Pestalotia theae* (Çayın Yaprak Noktası), *Phytophthora*, *Alternaria sp.* (Pirinç Tane Renklendirmesi), *Curvularia lunata* (Yonca Yaprak Noktası) ve *Rhizoctonia solani* gibi çeşitli bitki hastalıklarına neden olan bitki patojen mantarlarına karşı arpa kitinaz genini eksprese eden *Escherichia coli*'nin geniş spektrumlu bir antifungal aktivite göstermiştir



*Phytophthora spp.:* *Phytophthora*, elmalarda yaka çürüklüğü, kök ve kök boğazı çürüklüğü ve meyve çürüklüğü hastalıklarına neden olmaktadır. Çoğunlukla çok yıllık bitkiler için önemlidir, çünkü bu bitkilerde ani ölümlere yol açmakta ve önemli zararlar oluşturmaktadırlar (Zentmyer ve ark., 1983).

*Penicillium spp.:* Elma ve armutlarda yaygın olarak rastlanmakta ve mavi küf hastalığına neden olan fungal bir hastalık etmenidir. Hastalık etmeni hasat sonrası ortaya çıkmakta ve yumuşak ya da ıslak çürüklük olarak da adlandırılmaktadır. Bu fungal etmen ısıya dayanıklı toksinler (patulin) üretirler ve bu yüzden de hastalanan meyveler meyve işleme yöntemlerinde kullanılmazlar. Fungal etmen her türlü meyvenin, yumrunun ve köklerin kesik ya da yaralanmış yüzeylerinden giriş yapar ve şekerpancari, patates, sarımsak, havuç, yenilebilir mantar, kabak, ve diğer bir çok tohumlu bitkide de hastalık ortaya çıkmaktadır (Patel ve ark., 2016).

*Sclerotinia sclerotiorum:* Kozmopolitan bir patojen olup, farklı familyalardan 278 cinse ait yaklaşık 408 bitki türünde beyaz çürüklük, gövde çürüklüğü ve meyve çürüklüğü olarak adlandırılan hastalıklara neden olmaktadır. Fungusun hayatta kalmasında ve bir sonraki yıla geçmesini sağlayan en önemli yapısı kalın çeperli dinlenme formu olan sclerotiumları olup sekiz yıla kadar toprakta canlılıklarını kaybetmeden kalabildikleri belirtilmektedir (Yanar, 2005).

Watanabe ve arkadaşları (1992), *B. thuringiensis* kitinazının, *S. sclerotiorum* ve soya fasulyesi tohumlarındaki diğer fitopatogenik mantarların biyo-kontrolüne katkıda bulunabilir olduğunu belirtmişlerdir. Soya fasulyesi tohumları *S. sclerotiorum* ile enfekte edildiğinde, çimlenme % 93'ten % 25'e düşmüştür; Kitinaz ilavesi, çimlenmeyi % 90'a arttırmıştır (Watanabe ve ark., 1992) .

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Deneysel Çalışmada Kullanılan Materyaller

##### 3.1.1. Çalışmada kullanılan aletler

Çalkalamalı inkübatör, mikrosantrifüj, spektrofotometre, su banyosu, pH metre, hassas terazi, jel elektroforez sistemi gibi cihazlar kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Kimyasalın Adı	Firma adı
3,5 Dinitrosalisilik Asit	Sigma Aldrich
Agar	BD Bacto Agar
Akrilamid	Merck
Amonyum Sülfat	Sigma Aldrich
APS	Sigma Aldrich
Aseton	Sigma Aldrich
BSA	Promega
Coomassie Brilliant Blue	Thermo Scientific
Disodyum Hidrojen Fosfat	Merck
Disodyum Hidrojen Fosfat Hepta Hidrat	Merck
DTT	Thermo Scientific
Etanol	Sigma Aldrich
Monosodyum dihidrojenfosfat	Sigma Aldrich
Genomik DNA izolasyon kiti	Rta Lab
Gliserol	Euromedex
Glisin	Medikal Lab
Hidroklorik Asit	Merck
K/Na Tartarat	Sigma Aldrich

Çizelge 3.1. (Devam) Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Kimyasalın Adı	Firma adı
Kitin	Sigma Aldrich
Metanol	Merck
Nişasta	Alev Kimya
Patato Dekstroz Agar	BD Bacto
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Sigma Aldrich
SDS	Serva
Sodyum sitrat	Vankim
Sodyum Hidroksit	Merk
Sodyum Klorür	Sigma Aldrich
TEMED	Biorad
Tris	Sigma
Yeast Ektrakt	Difco

### 3.1.3. Mikroorganizmaların üretilmesinde kullanılan besiyerleri

Çalışmalarda kullanılan bütün besiyerleri otoklavda 121 °C’de, 15 dakika süreyle steril edilmiştir.

#### Kitin içeren LB besiyeri (Luria-Bertoni Broth)

Mikroorganizmadan kitinaz enzimini üretmek için ilk olarak hazırlanan genel besiyeridir. İçeriği Çizelge 3.2.’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. LB besiyeri için gereken madde miktarları

Bileşimi	g/L
Maya ekstraktı	5
Pepton	10
Sodyum klorür	10
Kolloidal Kitin	10

### CHDA agar (Chitinase-detection agar)

Doğal ortamdan alınan mikroorganizmalardan kitinaz aktivitesine sahip olanları belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Selektif besiyeridir. İeriği Çizelge 3.3.'te verişmiştir.

Çizelge 3.3. CHDA besiyeri için gereken madde miktarları

Bileşimi	g/L
Disodyum hidrojen fosfat	0.65
Sodyum klorür	0.25
Potasyum dihidrojen fosfat	1.5
Amonyum klorür	0.5
Yeast ekstrat	0.12
Koloidal kitn	10
Agar	20

### PDA besiyeri (Potato Dextrose Agar)

Kitinaz enziminin antifungal aktivitesini belirlemede gerekli olan küflerin geliştirilmesi için kullanılmıştır. Maya ve küfler için selektif katı besiyeri olarak kullanılır. İeriği Çizelge 3.4.'de verişmiştir.

Çizelge 3.4. PDA besiyeri için gereken madde miktarları

Bileşimi	g/L
Glikoz	20
Agar	15
Potato infusion	4

#### **3.1.4. Çalışmada kullanılan organizmalar**

Çalışmamızda kitinaz aktivitesi gösteren mikroorganizmamızın antagonistik etkisini belirlemek amacıyla, 7 adet fungus kullanılmıştır. Bu test fungusları *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora* sp., *Sclerotinia*,

*Penicillium* sp. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesindeki kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Funguslar PDA besiyerinde çoğaltılmışlardır. Kitinaz üreticisi mikroorganizma, topraktan izole edilmiştir.

### 3.1.5. Kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanması

#### Lügol çözeltisi

Lügol çözeltisi, iyot elementi ile potasyum iyodürün suda çözünmesiyle elde edilen bir karışımdır. Amilaz aktivitesini gözlemlemek amacıyla kullanılmıştır. Çözeltinin içeriği Çizelge 3.5.'te verilmiştir.

Nişasta + Lügol Çözeltisi ----- > Mavi - Mor Renk

Çizelge 3.5. Lügol çözeltisi için gerekli olan madde miktarları

Bileşimi	g/100 mL
İyot	7
Potasyum İyodür	3

Hazırlanan çözelti koyu şişede muhafaza edilmiştir.

#### Sodyum-Sitrat tamponu

pH 2.0-4.0 aralığındaki kitinaz aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. Tampon hazırlanırken; 0.2 M Sitrik Asit ve 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O çözeltileri hazırlanmış ve distile su ile uygun oranlarda karıştırılıp istenilen pH değerinde yeni tamponlar elde edilmiştir.

#### Fosfat tamponu

Kitinaz enziminin pH 5.0-8.0 aralığındaki aktivitesinin saptanması için kullanılmıştır. 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O hazırlanıp, istenilen pH aralıklarına göre uygun miktarda distile su eklenerek farklı tamponlar oluşturulmuştur.

### Glisin-NaOH tamponu

pH 9.0'daki enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. 0.2 M Glisin ve 2 M NaOH'in farklı oranlarda distile suyla karıştırılması ile hazırlanmıştır. Son hacim 50 ml'ye tamamlanmıştır.

### %1'lik nişasta çözeltisi

Kitinaz enziminin nişasta substratındaki aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. 0.1 g çözünür nişasta 10 ml su ile karıştırılmıştır.

### %1'lik kitin çözeltisi

Kitinaz enziminin kitini substrat olarak kullandığındaki aktivitesini belirlemek için hazırlanmıştır. 0.1 gr toz haldeki kitin 10 ml su ile karıştırılmıştır.

### %1'lik koloidal çözeltisi

Koloidal hale getirilen kitinden 0.1 gr alınarak 10 ml deiyonize su ile karıştırılmıştır. Kitinaz enzimin aktivitesini belirlemede kullanılmıştır.

### DNS (3,5-Dinitrosalisilik) çözeltisi

Enzim aktivitelerinin durdurulması ve reaksiyon sonucu oluşan indirgen şeker miktarının saptanması için kullanılmıştır. Sutha ve arkadaşlarının (2011), belirledikleri yöntemle göre hazırlanmıştır. 1 g DNS, 20 ml 2 M NaOH içinde çözülmüştür. Kaynar su içine konularak çözünme hızlandırılmıştır. Üzerine 50 ml distile su ilave edilip karıştırıldıktan sonra 30 g Na-K tartarat ilave edilmiş ve toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan DNS reaktifi oda sıcaklığında koyu renkli şişede saklanmıştır.

### Koloidal kitinin hazırlanması

Kitinaz aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak kullanılmıştır. Shekhar ve arkadaşlarının (2014), belirledikleri yönteme göre hazırlamıştır. 5 g toz halindeki kitin, 60 ml konsantre HCl'e yavaş yavaş ilave edilmiş, iyice karıştırıldıktan sonra, +4 °C'de bir gece yüksek devirde (400 rpm) manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışıma 2 L soğuk %95'lik etanole ilave edilmiş ve bir gece 25 °C'de bekletilmiştir. Oluşan presipitat 5000 rpm'de 20 dk +4 °C'de santrifüj edilerek bir arada toplanmıştır. Steril distile su ile, koloidal kitin nötral (pH 7.0) oluncaya kadar yıkama işlemi yapılmıştır. Son oluşan pellet 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### Bradford reaktifinin hazırlaması

0,1 g Coomassie brilliant blue G-250

50 ml %95'lik etil alkol

100 ml %85'lik fosforik asit

1000 ml'ye tamamlanarak karanlıkta bir gece boyunca karıştırılmış ardından filtre kağıdında süzülmüştür.

### Elektroforez uygulamalarında kullanılan solüsyonlar

Stoscheck'ün (1990), belirlediği yöntemle SDS-PAGE prosedürü gerçekleştirilmiştir.

%30 akrilamid: 29 g akrilamid, 1 g N, N-metilen bis akrilamid 60 ml deiyonize su ile karıştırılıp, son hacim olarak 100 ml ye tamamlanmıştır. pH 7.0'ye ayarlanıp 4 °C'de karanlık şişede saklanmıştır.

%10 sodyum dodesil sülfat (SDS): 10 g SDS 90 ml deiyonize suda çözdürülüp, 68°C'ye ısıtılıp ve pH 7.2 olana kadar konsantre hidroklorik asit ile pH ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Stacking jel tamponu (üst tampon): 6.05 g tris 80 ml deiyonize su içerisinde çözdürülmüştür. Konsantre hidroklorik asit ile pH 6.8'e ayarlanıp ve son hacim 100 ml ye tamamlandıktan sonra 4°C'de saklanmıştır.

Resolving jel tamponu (Alt tampon): Tablodaki bileşikler su içerisinde çözüldürülmüştür. Konsantre HCl ile pH 8.8'e ayarlanıp ve son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir. Tamponun içeriği Çizelge 3.6.'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Resolveng jel tamponu için gereken madde miktarları

Yürütme Tamponu	Miktar
Tris base	30,3 g
Glisin	144 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O	1 L

%10 amonyum persülfat: Amonyum persülfat, akrilamid ve bisakrilamidin polimerizasyonunu için gerekli serbest radikalleri sağlar. 1 g APS 10 ml deiyonize su içerisinde çözdürülür. Küçük miktarlarda ve her hafta taze olarak hazırlanmalıdır. 4°C'de, koyu renkli şişede muhafaza edilmelidir.

TEMED (N, N, N,N-tetramethylethylenediamine): Akrilamid ve bisakrilamidin polimerizasyonunu hızlandırır. TEMED sadece serbest baz formunda çalıştığından, pH düşük olduğunda polimerizasyon inhibe olacaktır.

Elektroforez (Tris- glisin) tamponu: 3 g tris ve 14.4 g glisin 1 g SDS 1000 ml içerisinde çözüldürülür.

Örnek yükleme Tamponu (5X Sample buffer) :Protein örneklerinin jele yüklenmesi sırasında kullanılır. Gereken madde miktarları Çizelge 3.7.'de verilmiştir.



Çizelge 3.7. Örnek yükleme taponu için gereken madde miktarları

Bileşimi	10 ml
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.6 ml
%50 Gliserol	5 ml
%10 SDS	2 ml
2-mercaptoethanol	0.5 ml
%1 bromophenol blue	1 ml
H <sub>2</sub> O	0.9 ml

+4°C’de birkaç hafta, -20 °C’de birkaç ay muhafaza edilebilir.

#### SDS-PAGE Jel boyama çözeltisi (Staining)

Elektroforezden sonra protein bandlarının jel üzerinde görünür hale gelmesini sağlamak için kullanılır. Jeli boyamak için gerekli olan madde miktarları Çizelge 3.8.’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. SDS-PAGE jel Boyama çözeltisi için gerekli madde miktarları

Bileşimi	1000 ml
Coomassie Blue R-250	0.5 g
Metanol	450 ml
Asetik Asit	100 ml
H <sub>2</sub> O	450 ml

Boya metanolde çözüldükten sonra filtre kâğıdından süzdürülüp asetik asit ve su ilave edilir. Koyu renkli şişede ve 4 °C’de saklanmalıdır.

Jelden boyayı geri alma (destaining) çözeltisi

Mavi renge boyanan jelde sadece bandların görünmesi için uygulanır. Çizelge 3.9.'da gereken madde miktarları verilmiştir.

Çizelge 3.9. Jelden boyayı geri alma için gerekli olan kimyasallar

Bileşimi	1000 ml
Metanol	100 ml
Asetik asit	100 ml
H <sub>2</sub> O	800 ml

% 12 Konsantrasyonunda yürütme jelinin hazırlanması

Çizelge 3.10. Yürütme jeli için gerekli olan kimyasallar

Bileşimi	15 ml
H <sub>2</sub> O	4.9 ml
%30 Akrilamid	6 ml
Tris (pH 8.8)	3.8 ml
%10 SDS	0.15 ml
%10 APS	0.15 ml
TEMED	0.006 ml

% 5 Konsantrasyonunda yükleme jelinin hazırlanması

Çizelge 3.11. Yükleme jeli için gerekli olan kimyasallar

<b>Bileşimi</b>	<b>3ml</b>
H <sub>2</sub> O	2.1 ml
%30 akrilamid	0.5 ml
Tris (pH 6.8)	0.38 ml
% 10 SDS	0.03 ml
% 10 APS	0.030 ml
TEMED	0.003 ml

Bütün malzemeler eklendikten sonra en son TEMED eklenir ve polimerleşen yürütme jelinin üzerine dökülür. Polimerleşme tamamlandıktan sonra protein yüklemesi yapılır.

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Toprakтан kitinaz üreten suşların izolasyonu

Tokat Yeşilirmak kenarından alınan toprak örnekleri 10 gr tartılarak 90 ml su içerisinde karıştırılmış 1 saat dinlendirildikten sonra üst sıvıdan 1 ml alınarak 100 ml LB besiyerine inoküle edilmiştir. Shakerda 37 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen kültürden, seri dilüsyon ( $10^{-6}$ - $10^{-7}$ ) yapılarak koloidal kitin içeren petrilere tek koloni düşecek şekilde yayma metoduyla ekim yapılmıştır. 37 °C'de 36 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tek düşen koloniler içerisinde zon (şeffaflaşma) oluşturanlar ikinci saflaştırma basamağı olarak saf kültür elde etmek için Chitinase-detection agar (CHDA) içeren besiyerine çizgi ekim yapılarak 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her gün kontrol edilerek üreme çizgisi hattında ve çevresinde hidroliz zonu oluşumu gözlemlenmiştir. Hidroliz zonu oluşturan 3 suş ayrılmış ve stok kültürleri yapılmıştır. En yüksek verimle kitinaz enzimi üreten mikroorganizmayı seçmek içinde, ayrı ayrı koloidal kitin içeren sıvı besiyerlerinde 48 saatlik üretimler gerçekleştirilip maksimum enzim aktivitesi gösteren organizma ile devam edilmiştir.

### 3.2.2. İzole edilen kitinaz üreticisi bakterinin tanılanması

#### Gram Boyama

Boyama prosedürü Coico'nun (2005), yöntemine gerçekleştirilmiştir.

- İzolatlar LB besiyerinde 24 saat geliştirilmiş ve kültürden bir öze dolusu alınarak lam üzerine yayılmıştır.
- Örnek kurutulduktan sonra ateşten birkaç kez geçirilerek fiksasyon yapılmıştır.
- Preparat üzerine kristal viyole damlatılarak 1 dk bekletilmiş sonra soğuk musluk suyu ile yıkanmıştır.
- Lamdaki örneğin tamamı iyot-lügol çözeltisi ile boyanıp 1 dakika bekletilmiştir. Preparat, suyla yavaşça yıkanmıştır.
- Örnekteki mor renk gidinceye kadar (15 saniye) %96'luk etil alkol ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Lam soğuk sudan geçirilip safranin ile 30 sn bekletilmiş, saf suyla yıkanıp açık havada kurumaya bırakılmıştır.
- İmmersiyon yağı damlatılarak mikroskopta 100X objektif kullanılarak incelenmiştir.

### Genetik Tanılama

Topraktan izole edilen mikroorganizmanın türünü belirlemek amacıyla genetik tanıma yapılmıştır. Bunun için 5 ml LB besiyerinde büyütülen bakteriler OD:1 olunca santrifüj edilip Biorad DNA İzolasyon Kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır.

DNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

1. OD:1.0 olan hücrelerden 1,5 ml ependorfa alınarak 8000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
2. Süpernatantı atılarak peletin üzerine 200 µl CL buffer eklenerek süspansiyon edilmiştir.
3. Daha sonra 20 µl RNase A (20 mg/ml) eklenmiş, karışması için vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiştir.
4. Sonra örneğe 20 µl Proteinaz K (20 mg/ml) ve 400 µl Buffer BL eklenmiş ve karışması için hızlıca vortekslenmiştir.
5. 56°C' de 10 dakika inkübe edilmiş ve kısa bir santrifüj ile iç çeperlerdeki tüpün dibine doğru indirilmiştir.
6. Lizatın üzerine 400 µl saf etanol eklenmiş, vorteks ile iyice karıştırılmıştır ve kısa bir santrifüj ile iç çeperlerdeki tüpün dibine doğru temizlenmiştir.
7. Karışımdan 700 µl dikkatlice SV kolona transfer edilmiş, kolonun kapağı kapatılmış, 6000g'de (>8000 rpm) 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonun altına inen sıvı atılmıştır.
8. Karışım bitene kadar 7. basamak tekrarlanmış ve sonrasında kolonun altında ki toplama tüpü yenisi ile değiştirilmiştir.
9. 600 µl Buffer BW eklenmiş ve 6000g'de (>8000 rpm) 1 dakika santrifüj edilmiş ve toplama tüpü yenisi ile değiştirilmiştir.
10. 700 µl Buffer TW eklenmiş ve 6000g'de (>8000 rpm) 1 dakika santrifüj edilmiş, aşağı inen sıvı atılmış ve kolon tekrar toplama tüpüne takılmıştır.
11. Yıkama solüsyonu kalıntılarının kolon duvarlarından temizlenmesi için 1 dakika son hızda santrifüj yapılmış ve SV kolon yeni 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne alınmıştır.

12. 200 µl Buffer AE eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra son hızda 1 dakika santrifüj yapılmış ve alt tarafta DNA elde edilmiştir.

### **3.2.3. Optimum Kitinaz Enzim Aktivite Zamanının Belirlenmesi**

250 ml'lik erlene 100 ml koloidal kitin ile hazırlanmış sıvı besiyeri konulup otoklavlanmıştır. 5 ml LB besiyerine -80 °C'den alınan stok kültürden 100 µl alınarak organizmanın aktifleşmesi sağlanmıştır. 18 saatlik aktifleştirilmiş olan kitinaz üreticisi bakteriden erlene 1 ml eklenip çalkalamalı olarak 30 °C'de 200 rpm'de 39 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Maksimum aktivitenin belirlenmesi için belirli aralıklarla inkübasyon sonlandırılıp santrifüjlenmiştir. Süpernatantta bulunan enzim aktivitesi ölçülmüştür.

### **3.2.4. Antifungal aktivite testleri**

Fungal patojenler, tohum kuvvetini azalttıkları ve bitkinin büyüme aşamalarında zayıflattığı için zararlıdır. Mantarların neden olduğu tohum kaynaklı hastalıklar, mantar hiflerinin yerleşmesi ve uyku haline gelmesinden dolayı kontrol edilmesi zordur. Eğer enfekte veya kontamine olmuş tohum, kontamine olmayan toprakta ekilirse, patojen bu toprakta çoğalabilir.

Çalışmamızda *A. niger*, *F. solani*, *A. alternata*, *B. cinerea*, *Phytophthora* sp., *Sclerotinia* sp., *Penicillium* sp. fungal patojenleri kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan patojen funguslar PDA besiyerinde çalışılmıştır. Fungal sporların petri yüzeyinde kontrolsüz olarak çoğalmasını önlemek için, ekim yapılırken petri kapları ters çevrilerek, üç nokta metodu ile fungusların ekim işlemleri gerçekleştirilmiştir. 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılarak misel oluşumları gözlemlendikten sonra antifungal aktivite testlerinde kullanılmışlardır.

### İzole edilen mikroorganizmanın fungal patojenler üzerine etkisi

Kitinaz üreticisi mikroorganizmanın fungal patojenler üzerindeki etkisini araştırmak için; PDA besiyeri içeren petrilerin bir ucuna test fungusları nokta ekimi ile inoküle edilmiştir. 30 °C’de 48 saat inkübasyonun ardından yeterli misel oluşumu gözlemlendikten sonra petrinin diğerk kısmına kitinaz üreticisi bakterinin ekimi gerçekleştirilmiştir. Ardından inkübasyona 24 saat daha devam edilmiştir. Sonrasında oluşan zonlar gözlemlenmiştir.

### Kısmi saflaştırılan kitinaz enziminin fungal patojenler üzerine etkisi

Kısmi olarak saflaştırılmış kitinaz enziminin test fungusları üzerindeki etkisi 2 farklı yol ile araştırılmıştır. Birinci yolda PDA besiyeri yüzeyinin tamamı enzim ile kaplanmıştır. İkinci yolda ise petrinin bir ucunda fungus ekimi diğerk ucunada enzim eklenmesi ile yapılmıştır.

Birinci yolda; PDA besiyerindeki petrinin yüzeyine 100 µL kısmi saflaştırılmış kitinaz enzimi yayılmıştır. Deneyde kontrol gruplarının yüzeyleri enzim ile kaplanmamıştır. Test fungusları üç nokta ekim yapılp 7 gün boyunca oluşan zonlar gözlemlenmiştir.

İkinci yol olarak PDA besiyeri içeren petrinin bir ucuna test funguslarının ekimi yapılmış ve 30 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat inkübasyonun ardından yeterli misel oluşumu gözlemlendikten sonra petrinin diğerk kısmına 30 µL kısmi saflaştırılmış kitinaz enzimi eklenmiş ve ilave 5 gün boyunca oluşan zonlar gözlemlenmiştir.

### **3.2.5. Kitinaz enzim aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesi**

Saflaştırılan 3 adet mikroorganizma, koloidal kitin içeren besiyerlerinde 39 saat boyunca çoğaltılmışlardır. Bu organizmalardan en çok kitinaz enzimini üreteni bulmak için erlenlerden 12. ve 24. saatte ve devamında her 3 saatte bir 1 ml örnek alınarak aktivitesine bakılmıştır. 39 saatin sonunda en fazla kitinaz enzimi üreten mikroorganizma ile çalışmalara devam edilmiştir.

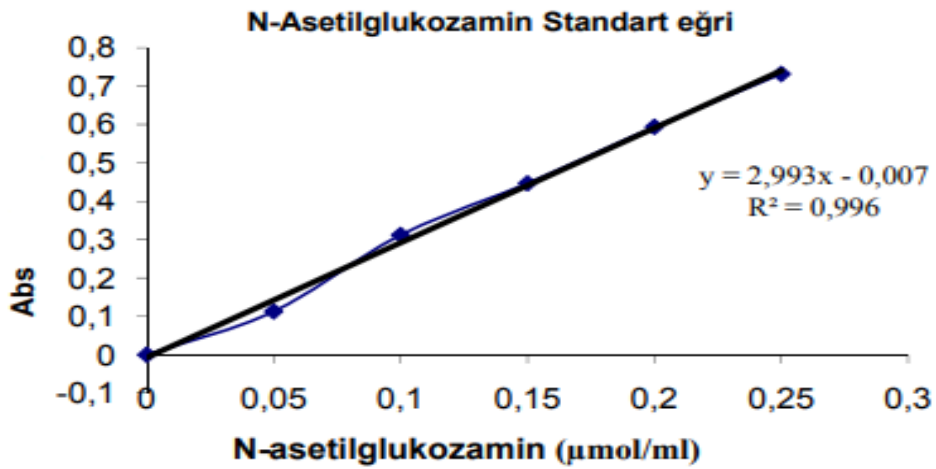
Aktivite tayininde;

1. Alınan 2 ml örnek 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Hem süpernatant hem pellet kısmına test yapılmıştır.
2. Süpernatanttan 100 µl örnek alınarak üzerine 900 µl substrat (% 1 kolloidal kitin içeren 0,05 M pH 7.0 fosfat tamponu) eklenmiş ve 35 C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
3. Su banyosundan çıkarılan tüpler 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
4. Süpernatanttan 1 ml, DNS reaktifinden 1 ml alınıp karıştırılmıştır. Kör olarak 1 ml su, 1 ml DNS reaktifi kullanılmıştır.
5. 15 dk 100 °C'de kaynatılmıştır.

Soğuduktan sonra 540 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Absorbanslar Üniteye çevrilerek tabloda gösterilmiştir. Grafikte maksimum aktivite saati tespit edilmiştir.

Kitinaz enziminin aktivitesi belirlenirken hazırlanan standart eğri grafiğinden yararlanılmıştır. Bu standart eğri grafiği N-asetilglukozamin (NAG) standart çözeltisi kullanılarak çıkarılmıştır. 1 unite enzim aktivitesi, 1 dakikada 1 µmol NAG'in açığa çıkması için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Kitinaz enziminin aktivitesinin hesaplanabilmesi için gerekli olan standart eğri grafiği Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Kitinaz enziminin aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan standart eğri grafiği



### 3.2.6. Aktivite ölçümünde enzim miktarının optimizasyonu

Kitinaz aktivitesi ölçüleceği zaman kullanılacak enzim miktarını belirlemek için substrat (koloidal kitin) miktarı sabit tutularak 20 µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl, 100 µl, 120 µl enzim miktarlarıyla reaksiyonlar, 50 mM Fosfat (pH 7.0) tamponunda %1 koloidal kitin varlığında 35°C'de 60 dk süre ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar sonucunda aktivite ölçümü çalışmalarında kullanılacak enzim miktarı belirlenmiştir.

### 3.2.7. Bradford metodu ile protein miktarı tayini

Bu yöntemde, proteinindeki pozitif yüke bağlanan negatif yüklü Commassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılarak 1-100 µg hassasiyette ölçümler gerçekleştirilmiştir (Ernst ve ark., 2010). Protein miktarı tayini için 50 µl saflaştırılmış enzim örneği üzerine 1 ml Bradford reaktifi eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika karanlıkta bekletildikten sonra UV spektrofotometrede 595 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Kör olarak enzim yerine 50 µl distile su kullanılmıştır. Ölçüm sonucu elde edilen değerlerden protein miktarı hesaplanmıştır.

Sığır serum albumin (BSA) standardı, saf su ile 1 mg/ml stok olarak hazırlanmıştır. Bu stoktan 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 mg/ml olacak şekilde seyreltmeler yapılarak standartlar hazırlanmıştır. Seyreltme çözeltilisi olarak saf su kullanılmıştır. Standart eğriden elde edilen formüle göre örneklerin protein miktarları bulunmuştur.

Spesifik enzim aktivitesi = toplam enzim aktivitesi (U) / toplam protein miktarı (mg)  
formülüne göre hesaplanmıştır.

### 3.2.8. Kitinaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu

#### Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Amonyum sülfat çöktürme, bir çözeltiliden protein saflaştırması ve konsantre edilmesi için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Solüsyonda, proteinler açığa çıkan kutupsal ve iyonik grupları boyunca su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturur.

Yüksek konsantrasyonlarda, amonyum sülfat gibi yüklü iyonlar eklendiğinde, bu gruplar su moleküllerine bağlanmak için proteinlerle rekabet eder. Bu, su moleküllerini proteinden uzaklaştırır ve çözünürlüğünü azaltıp çökelme ile sonuçlanır. Belirli bir proteinin çökeleceği konsantrasyonu etkileyen kritik faktörler şunları içerir: Kutupsal grupların sayısı ve konumu, proteinin moleküler ağırlığı, çözeltinin pH'sı ve çökelmenin gerçekleştirildiği sıcaklık. Amonyum sülfat protein çöktürmede genellikle tercih edilen bir tuzdur, çünkü ucuzdur, suda çok çözünürdür ve diğer iyonik çözücülerden çok daha fazla hidratlanabilir (daha fazla su molekülü ile etkileşime girebilir). Amonyum sülfat çökeltmesi, yalnızca proteinlerin çözünürlüğünü azaltır, denatüre etmez.

Koloidal kitin içeren 200 ml'lik besiyerine 18 saatlik aktif kültürden %1 olacak şekilde inokülasyon yapılmış shakerda 30 °C'de 200 rpm'de inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonrasında 6000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek hücre peleti uzaklaştırılmıştır. Santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant (200 ml) ile amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirilmiştir. Enzimin çöktüğü amonyum sülfat doyumluk aralığı EK 1'de verilen tablodan hesaplanarak bulunmuştur. Kitinaz enzimi için her amonyum sülfat doyumluk aralığında çökelek ve süpernatantta enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık kitinaz enziminin amonyum sülfat doyumluk aralığı olarak kabul edilmiştir.

Kitinaz enzimimizin boyutunu bilemediğimiz için gradient çöktürme uygulanmıştır. % 20 için gerekli olan amonyum sülfat miktarı her 100 ml için 10.7 g olarak hesaplanmış ve +4 °C'deki manyetik karıştırıcı üzerindeki enzim solüsyonuna yavaş yavaş ilave ederek çözünmesi sağlamıştır. 2 saat süren karıştırmanın ardından 10000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet 0.05 M fosfat tamponunda (pH 7.0) çözülerek aktivitesine bakılmak üzere +4°C'de saklanmıştır. Süpernatanta, % 40 için gerekli olan amonyum sülfat miktarı her 100 ml için 10.99 g olarak hesaplanmış ve +4 °C'deki manyetik karıştırıcı üzerindeki enzim solüsyonuna yavaş eklenmiştir. 4 saat karıştırıldıktan sonra karışım 10000 rpm'de +4 °C'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Pelet için aynı işlem gerçekleştirilip +4 °C'de saklanmıştır. Aynı işlemler %60 için de yapılmıştır. Son çöktürme işleminin ardından elde edilen süpernatantta ve peletlere aktivite tayini yapılmıştır.

Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra elde edilen %60 aralığındaki çökelekler, enzim aktivitesini etkileyen safsızlıklar ve iyonların uzaklaştırılması için 10000 Da cut off değerine sahip diyaliz membranına alınarak +4°C’ de pH 7.0 ve 0,05 M olan fosfat tamponunda 1 gece diyaliz yapılmıştır. Diyaliz tamponu düzenli aralıklarla değiştirilmiştir. Diyaliz sonrası ürün +4°C’de muhafaza edilmiştir.

#### Kitinaz enziminin çalıştığı optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Kısmi saflaştırılmış kitinaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 0.05 M pH 7.0 Fosfat tamponu ile hazırlanmış % 1’lik colloidal kitin substratı ile sırasıyla 20, 30, 40, 50, 60°C’de Eppendorf Termomixer cihazında gerçekleştirilen aktivite deneyleriyle bulunulmuştur. Aktivite tayini için 100 µL enzim ve 900 µL substrat karıştırılarak standart aktivite tayini yapılmıştır.

#### Kitinaz enziminin saklanma koşullarının belirlenmesi

Kısmi olarak saflaştırılan kitinaz enziminin diyaliz sonrasında bir kısmı liyofilizatörde kurutularak muhafaza edilirken bir kısmı da 4°C’de 20°C’de ve -20°C’de saklanmıştır. Belirli süreler sonunda enzimlerin aktivitelerine bakılmıştır. Bu sayede enzimin sıcaklık stabilizasyonu belirlenmiştir.

#### Kitinaz enziminin çalıştığı optimum pH’ın belirlenmesi

Kitinazın en iyi çalıştığı pH’yı bulmak için, pH’sı 2.0-4.0 olan 50 mM Sitrat tamponu, pH’sı 5.0–8.0 olan 50 mM Fosfat tamponu, pH’sı 9.0 olan 50 mM Glisin-NaOH tamponları kullanılarak içerisinde %1 kitin bulunan substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Aktivite tayini için 100 µL enzim çözeltisi ile 900 µL substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 60 dakika 35°C’de reaksiyona sokulmuştur. Su banyosundan çıkarılan tüpler 10000 rpm’de 10 dk santrifüjlendikten sonra 1 ml DNS reaktifi eklenip 10 dakika kaynatılarak reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Son olarak köre karşı 540 nm’de spektrofotometrede ölçülmüştür. Gözlenen optimum pH daha sonraki deney şartlarında kullanılacak olan reaksiyon pH’sı olarak belirlenmiştir.

### Farklı substratlarda kitinaz aktivitesi

DNS yöntemi ile indirgen şeker analizi yapıldığı için ve çalışmamızda enzim karışımı kullanıldığı için, kısmi olarak saflaştırılan kitinaz enzim karışımının 4 farklı substrata ilgisi araştırılmıştır. Daha önceden saflaştırılmış olan (amonyum sülfat ile çöktürülüp, diyaliz işlemi yapılmış olan) kitinaz enziminin koloidal kitin, nişasta, selüloz ve kitin substratlarına karşı göstermiş olduğu aktivite değerleri ölçülerek substrat spesifitesi belirlenmiştir. Substratlar %1 oranında hazırlanarak, 0,05M fosfat tamponunda (pH 7.0) çözülmüştür. Selüloz olarak filtre kağıdı kullanılmıştır. Aktivite değeri daha önce açıklanan standart DNS yöntemi ile belirlenmiştir.

Aktivite testi için en uygun tampon olan fosfat tamponu (pH 7.0) ve en uygun sıcaklık değeri olarak 30 °C kullanılmıştır. 60 dakikalık inkübasyon sonucunda DNS metodu ile spektroskopik ölçümü yapılmış ve absorbans değerleri üniteye çevrilmiştir.

### Kitinaz enzim kinetiğinin belirlenmesi

Saflaştırılan kitinaz enziminin kinetik sabitlerinin belirlenmesi için 0.05 M pH 7.0 fosfat tamponu ile %0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 2'lık koloidal kitin substrat çözeltisi hazırlanmış ve kitinaz enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlara sahip koloidal kitin substratı hazırlanmak için %2'lik stok çözerli hazırlanmış ve farklı konsantrasyonlar için seyreltmeler yapılmıştır. Bütün konsantrasyonlarda enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

Substratların başlangıç konsantrasyonları “S”, enzim aktiviteleri “V” olarak kabul edilmiş, grafiğe 1/S ve 1/V şeklinde yerleştirilerek Lineweaver-Burke grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen grafiğin eğimi Michaelis Menten eşitliğinde kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  sabitleri bulunmuştur.

## SDS poliakrilamid jel elektroforezi

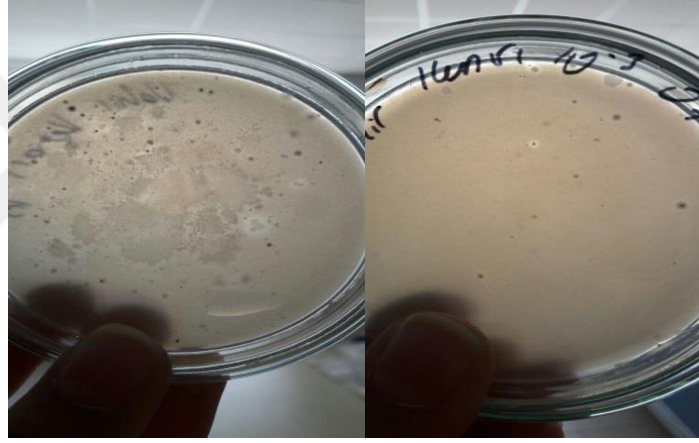
Enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Bu amaçla 10 mL alt jel hazırlanarak hava kabarcığı kalmadan 30-45 dk jelin polimerleşmesi beklenmiş, alt jel üzerine düzgün bir şekilde polimerleşmesi için su dökülerek, kurutma kağıdı ile jele zarar vermeden uzaklaştırılmıştır. Üst jel hazırlanıp alt jelin üzerine döküldükten sonra, hızlıca tarak yerleştirilmiş ve 30 dk boyunca jelin polimerleşmesi sağlanmıştır.

25'er µl protein ebatları belirlenecek örneklerden, 0.5 ml' lik santrifüj tüplerine 5'er µl sample buffer ile birlikte eklenmiş ve vortekslenerek civarlara bulaşan örnekler 8000 rpm de 3-4 sn spin yapılarak toplanmıştır. Proteinlerin denatürasyonu 100 °C'de 10 dk süreyle gerçekleştirildikten sonra, buz üzerine alınmıştır. Hazır olan jelin üzerinden tarak dikkatlice alındıktan sonra açılan kuyular, yürütme tamponu ile pipet yardımıyla yıkanmıştır. Jeller kasete yerleştirilip, markerdan 5 µl, örneklerden 20 µl pipet yardımı ile jele yüklenmiştir. Örnekler üst jeli geçene kadar 100 V, alt jelde 150 V'ta yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue (%0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyanmış, hemen ardından yıkama solüsyonunda gece boyu yıkanarak jel görüntüsü alınmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1.CHDA'da (Chitinase-detection agar)'da Kitinaz Üreten Suşların Saptanması

Nehir kenarından alınan örnekler kitin içeren besiyerine ekildikten 36 saat sonrasında petrilere zon oluşumu gözlemlenmiştir. Zon oluşturan birbirinden morfolojik olarak farklı kolonilerden rastgele olarak 10 örnek alınmış ve yeni petrilere tek nokta ekimleri yapılmıştır. En büyük zon çapını 4, 7 ve 10 numaralı örnekler oluşturmuştur. Bu üç örnekte tek petride ekimleri yapılarak zon çapları ölçülmüş ve en büyük zon oluşturan 10 numaralı örnek ile çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 4.1. CHDA agarda kitinaz üreticisi organizmaların zon oluşturanlardan seçilimi

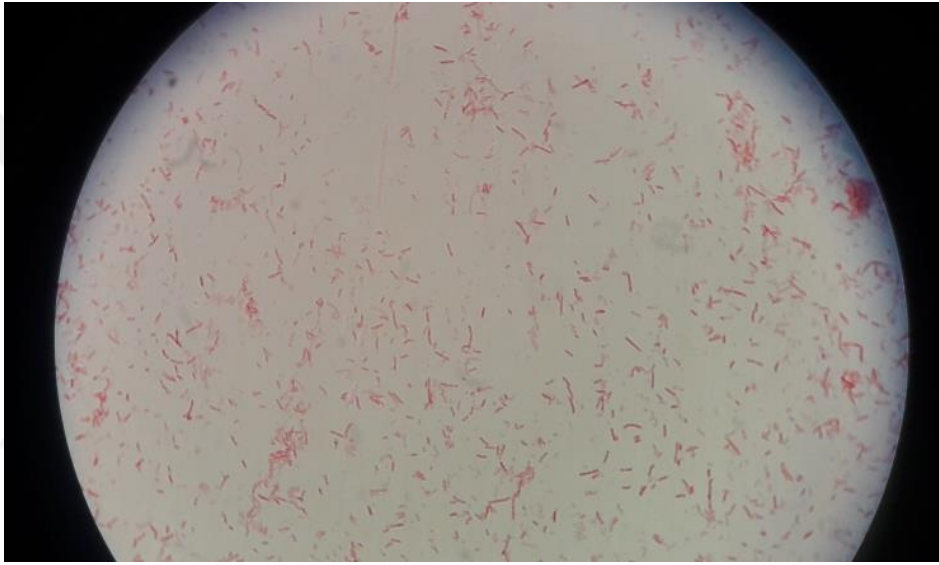


Şekil 4.2. (a): CHDA agarda kitinaz üreticisi 3 organizmanın oluşturduğu zonlar (b): CHDA agarda en büyük zonu oluşturan kitinaz üreticisi 10 organizmanın oluşturduğu zon

## 4.2. İzole edilen Kitinaz Üreticisi Bakterinin Tanınması

### 4.2.1. Gram boyama

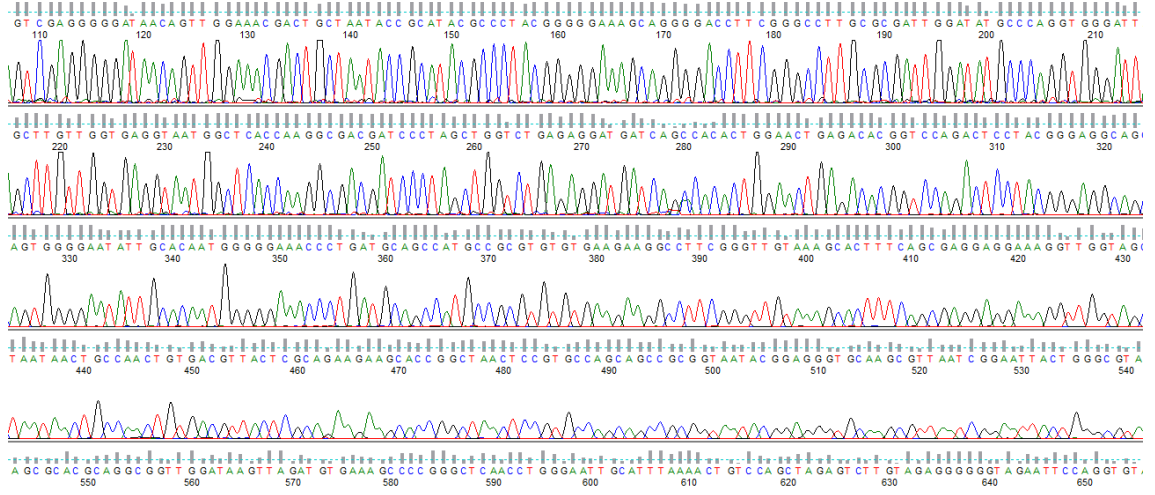
Seçilen 10 numaralı mikroorganizma gram boyanma özelliklerine göre tanımlanmıştır. Gram boyama prosedürüne göre boyama gerçekleştirilmiş ve organizmanın gram negatif olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 4.3.'te ışık mikroskobu ile görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.3. Kitinaz üreticisi mikroorganizmanın ışık mikroskobu ile görüntüsü (100x)

### 4.2.2. Genetik tanılama

Gram negatif olan organizmanın 27F ve 907R bakteri primerleri ile yapılan 16S rRNA dizi sonucu elde edilen kromotogramlar Finch TV Version 1.4.0 programı kullanılarak açılmış ve görüntüsü Şekil 4.4'de verilmiştir. Kromotogram temizlenip forward ve reverse diziler birleştirildiğinde elde edilen 825 bp, biyoinformatik sitelerinde bilinen türlerin dizilerine karşı taranmıştır. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Fast Minimum Evolution algoritması kullanılarak elde edilen soyağacı ve dizi Şekil 4.5'da verilmiştir.

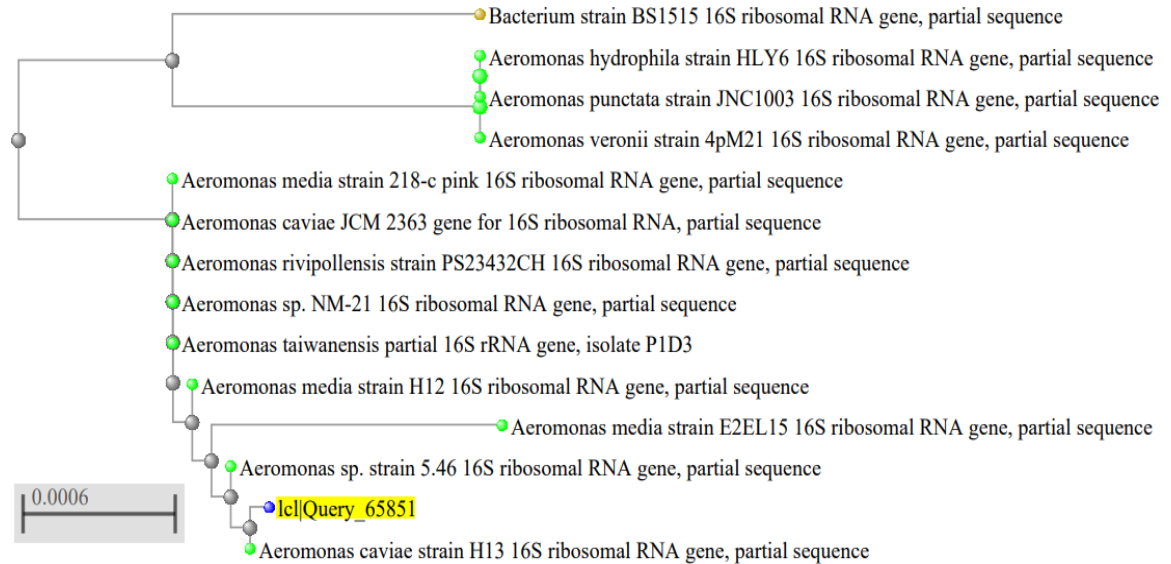


Şekil 4.4. 27F primeri ile oluşturulan 16s rRNA dizi analizi kromotogramı

```

5'-CATGCATGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGGACGGGTGAGTAATGCCTG
GGAAATTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGG
GGACCTTCGGGCCTTGC GCGATTGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCGCA
CGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG
CACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAACTGTGACGTTACTCGAGAAGAAGCACCGGCTAA
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGC
GGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAAACCTGTCCAGCTAGAGTCTTGTA
GAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTAAATCG-3'

```



Şekil 4.5. Dizi sonucu ve soyağacı



Buna göre izolatın *Aeromonas caviae* strain H13 ile %99 benzer olarak yakın olduğu belirlenmiştir. Ancak soyağacına bakıldığında *Aeromonas* türleri arasında birbirine çok geçiş olduğu, *A. media* ve *A. taiwanensis* türlerinin de izolatımıza yakın olduğu görülmüştür. Herhangi bir karmaşaya yer vermemek için izolatımız *Aeromonas* sp. BHC02 olarak tanımlamıştır.

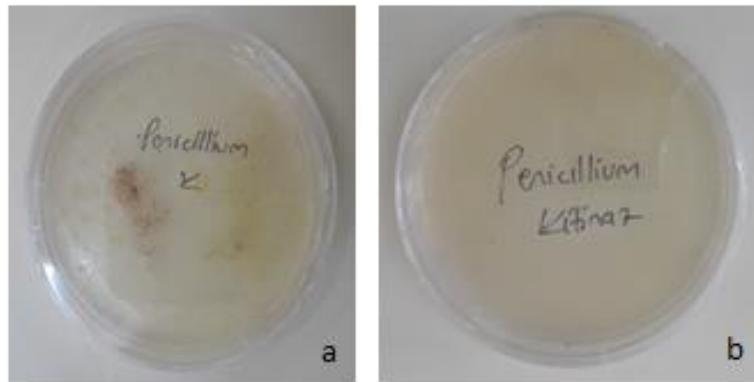
### 4.3. Antifungal Aktivite Testleri

#### 4.3.1. Mikroorganizmanın fungal patojenler üzerine etkisi

*Aeromonas* sp. BHC02 olarak tanımlanan 10 numaralı kitinaz üreticisi bakteri de petriye inoküle edilerek test fungusları ile birlikte inkübe edildiği deneyler sonucunda kitinaz üreticisi mikroorganizmanın test funguslarına karşı antagonistik bir aktivite gösterdiği tespit edilememiştir.

#### 4.3.2. Kitinaz enziminin fungal patojenler üzerine etkisi

Kısmi olarak saflaştırılmış kitinaz enziminin test fungusları üzerindeki etkisi 2 farklı yol ile araştırılmıştır. PDA besiyeri yüzeyinin enzim ile kaplandığı çalışmada, 7 günün sonunda yapılan gözlemlerde enzimin *Penicillium* dışındaki (Şekil 4.6.) diğer funguslarının büyümesi üzerinde herhangi bir inhibisyona yol açmadığı görülmüştür.

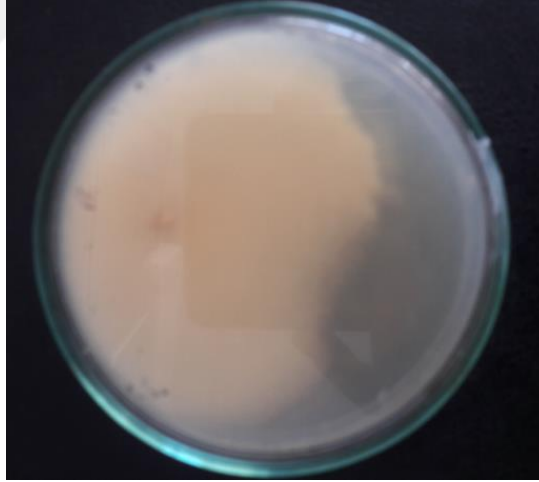


Şekil 4.6. (a): PDA agarda yüzeye herhangi bir işlem uygulanmadan *Penicillium* fungusunun büyümesi (b): Yüzeyine kitinaz enzimi uygulamış PDA agarda *Penicillium* fungusunun büyümesi

Test funguslarının misel oluşumu gerçekleştikten sonra kitinaz enziminin ilave edildiği çalışma sonucunda ise *A. alternata*, *F. solani*, *B. cinerea* funguslarına karşı şekillerde görüldüğü üzere inhibisyon zonları belirlenmiştir.



Şekil 4.7. PDA agarda *Alternaria alternata* fungusu üzerinde kitinaz enzimin inhibisyon zonu oluşturması



Şekil 4.8. PDA agarda *Fusarium solani* fungusu üzerinde kitinaz enzimin inhibisyon zonu oluşturması



Şekil 4.9. PDA agarda *Botrytis cinerea* fungusu üzerinde kitinaz enzimin inhibisyon zonu oluşturmaları

#### 4.4. Kitinaz Enziminin Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

##### 4.4.1. Kitinaz enziminin en yüksek üretiminin yapıldığı zamanın belirlenmesi

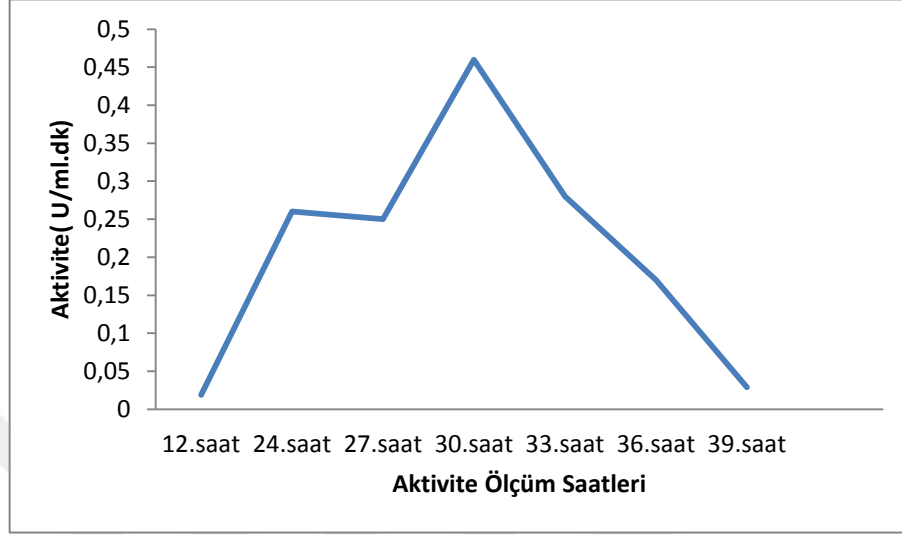
LB besiyerinde 18 saatlik ön aktivasyonu yapılan organizma, koloidal kitin içeren sıvı besiyerine inoküle edilerek kitinaz enzim aktivitesine bakılmıştır. 39 saat boyunca örnek alınarak aktivite testleri yapılmıştır. Spektrofotometreden alınan absorbans değerleri Üniteye çevrilerek maksimum enzim üretme zamanı belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Koloidal kitin içeren sıvı besiyerlerinde organizmanın 1. ve 39. Saat sonrası oluşan renk değişimleri

Süreç başında ve sonunda besiyerinin görüntüsündeki değişiklikler Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Kantitatif enzim aktiviteleri ölçümleri sonucunda ise mikroorganizmanın

maksimum enzim üretme zamanının 30. Saat olduğu Şekil 4.11.'de verilen grafikte gösterilmiştir.

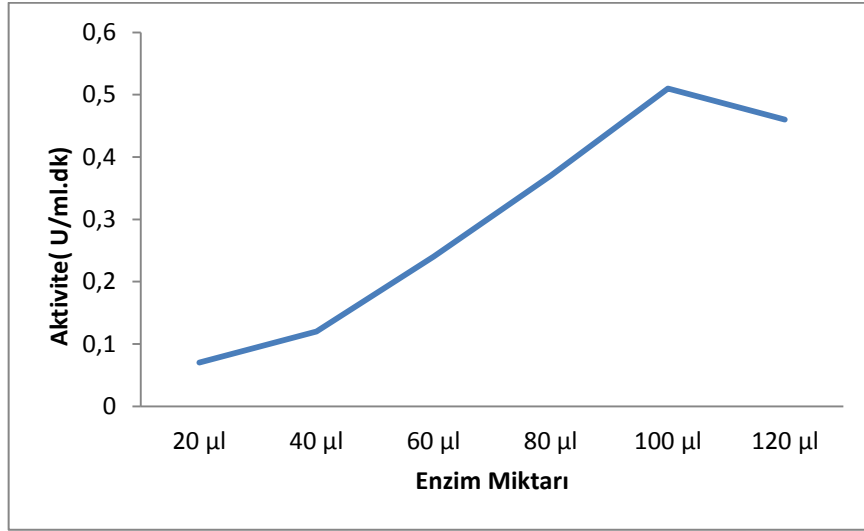


Şekil 4.11. Optimum kitinaz enzim üretiminin gerçekleştiği ikübasyon süresi

Hücrenin büyümesine bağlı olarak enzim aktivitesi giderek artma eğilimi göstererek 30. saatte maksimuma ulaşmış, daha sonra ise hızlı bir şekilde kitinaz enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür.

#### 4.4.2. Aktivite ölçümünde enzim miktarın belirlenmesi

DNS yöntemi ile ölçülen kitinaz enzim aktivitesi deneyinde kullanılacak optimum enzim miktarını belirlemek için koloidal kitin substrat miktarı sabit tutularak 5 farklı hacimde enzim miktarı araştırılmıştır. Şekil 4.12.'de sabit substrat miktarına karşı optimum enzim miktarının belirlendiği grafik gösterilmiştir.

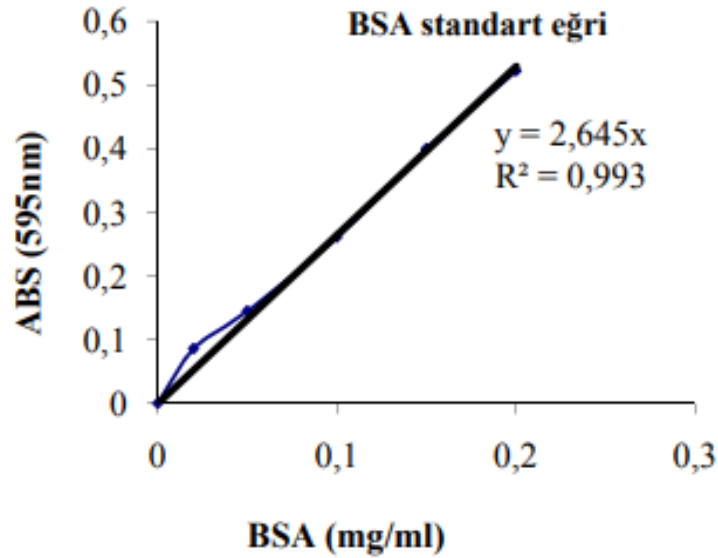


Şekil 4.12. Sabit substrat miktarına karşı optimum enzim miktarının belirlenmesi

Şekil 4.12’da görüldüğü üzere 100 µl enzim kullanıldığında optimum enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Sonraki çalışmalarda bu enzim miktarı kullanılarak devam edilmiştir.

#### 4.4.3 Bradford metodu ile protein miktarı tayini

Enzim karışımındaki toplam protein konsantrasyonunu belirlemek için Bradford yöntemi kullanılmıştır. BSA kullanılarak belirlenen ve protein konsantrasyonun hesaplanmasında kullanılacak standart grafik Şekil 4.13.’te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. BSA standart eğri grafiği

Buna göre  $y=2.645x$  denklemindeki  $x$  değeri, enzim karışımındaki bilinmeyen protein konsantrasyonunu verecektir.

Spesifik enzim aktivitesi= toplam enzim aktivitesi (U)/ toplam protein miktarı(mg) formülüne göre hesaplanarak bulunmuştur.

Diyaliz sonrası kısmi olarak saflaştırılmış ürünlerdeki örnek 1/10 ve 1/100 oranında seyreltilerek ölçüm yapılmıştır. BSA ile hazırlanmış olan standart grafiğın eğiminden örnekteki toplam protein miktarı 0.2509 mg/ml olarak bulunmuştur.

#### 4.4.4. Kitinaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi saflaştırılması ve diyaliz

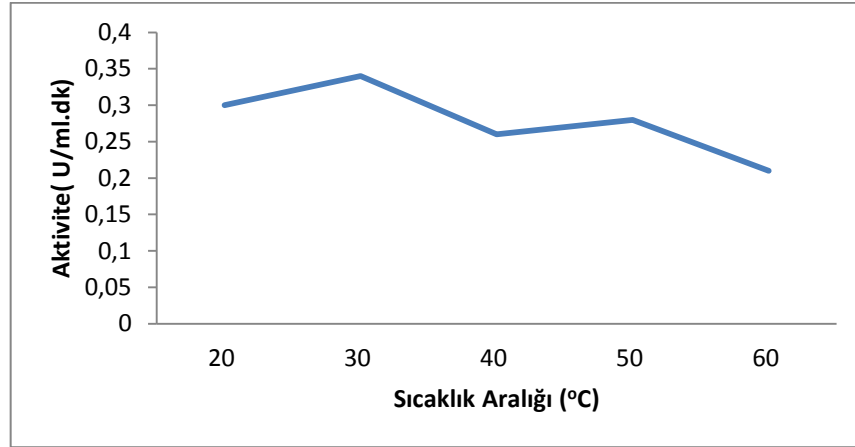
Gradient tuz çöktürme işlemi sonucunda peletlerde herhangi bir aktiviteye rastlanmamıştır. Çizelge 4.1.'de kısmi saflaştırılan kitinaz enziminin saflaştırma profili özetlenmiştir. %60 amonyum sülfat çöktürme sonrası kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi %5.17'lik verimle  $0,61 \pm 0,24$  U/mL olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Kısmi saflaştırılan kitinaz enziminin saflaştırma profili

	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite	Saflaştırma katsayısı	Saflaştırma Verimi (%)
Başlangıç	1.18	0.2509	4.703	1	100
%60 çöktürme	0.61	0.0907	6.73	1.43	5.17

#### 4.4.5. Kitinaz enziminin çalıştığı optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Şekil 4.14.'te pH 7.0'de kitinaz enzimin farklı sıcaklık aralığındaki aktivitesi grafik olarak gösterilmiştir. En uygun optimum sıcaklık değerinin  $30^{\circ}\text{C}$  olduğu görülmüştür.



Şekil 4.14. Kitinaz enzimin farklı sıcaklık aralığındaki aktivitesi

#### 4.4.6. Kitinaz enziminin stabilizasyonu

Diyaliz sonrası olan ürünün iki farklı sıcaklık değerinde uzun süre bekletilmesi sonucu aktivasyonunda oluşabilecek değerleri gözlemlemek için stabilizasyon testi uygulanmıştır. Çizelge 4.2.'de kitinaz enzimin farklı sıcaklıklarda stabilizasyonu özetlenmiştir.

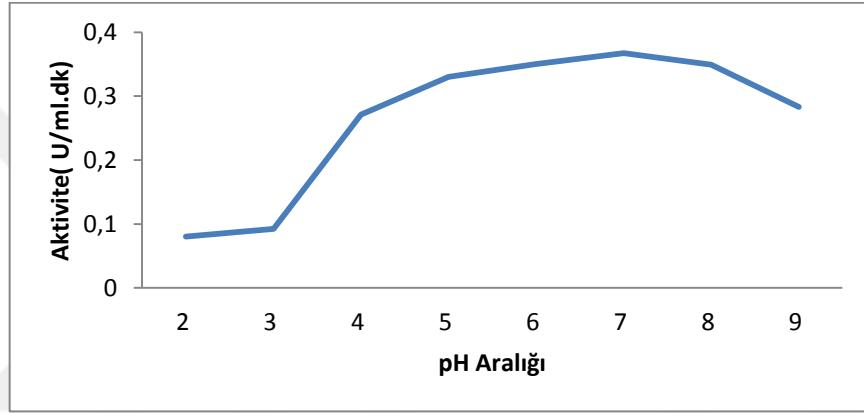
Çizelge 4.2. Kitinaz enzimin farklı sıcaklıklarda stabilizasyonu

	Başlangıç Aktivitesi (U/mL)	1. gün sonunda kitinaz aktivitesi (U/mL)	1.ay sonunda kitinaz aktivitesi (U/mL)	2.ay sonunda kitinaz aktivitesi (U/mL)
+4 °C	0.55±0,06	0.45±0.05	0.50±0.06	0.47±0.04
-20°C		0.52±0.03	0.37±0.06	0.42±0.02

20 °C'deki aktivitesinde birinci günün sonunda 0.42 U, beşinci günün sonunda 0.36U olmuştur. Aktivite 1. Ay sonunda kaybedilmiştir. Buna göre enzimin buzdolabında 2 ay boyunca saklanması aktivitesinin %85'ini koruduğu tespit edilmiştir. Bunun da ticari olarak önemli olduğu düşünülmektedir.

#### 4.4.7. Kitinaz enziminin çalıştığı optimum pH'ın belirlenmesi

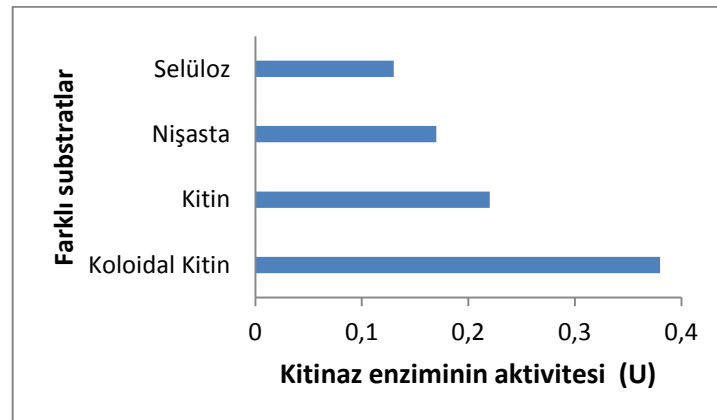
Substrat enzim reaksiyonunun en iyi çalıştığı pH aralığını bulmak yapılan çalışmada maksimum aktivitenin fosfat tamponunda pH 7.0'de gerçekleştiği görülmüş ve deneylerde bu değerin kullanılması belirlenmiştir. Ancak yine de enzimin geniş bir pH aralığında aktif olduğu görülmüştür. Şekil 4.15.'de kitinaz enzimin farklı pH aralığındaki tamponlarda aktivitesi grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Kitinaz enzimin farklı pH aralığındaki tamponlarda aktivitesi

#### 4.4.8. Farklı substratlarda kitinaz enzim karışımının aktivitesi

Şekil 4.16.'da kısmi saflaştırma sonucu elde edilen kitinaz enzim karışımının farklı substratlara karşı aktivitesi gösterilmiştir.





#### Şekil 4.16. Kitinaz enzimin farklı substratlardaki aktivitesi

Saflaştırılan enzim karışımında selüloz, amilaz aktiviteleri de gözlemlense de en yüksek aktivitenin substrat maddesi olarak koloidal kitin kullanıldığında elde edildiği bulunmuştur. Buna göre karışımda her ne kadar selüloz ve amilaz aktivitesi gösteren enzimler olsa da kitinazın daha yüksek oranda bulunduğu kabul edilmiştir.

#### 4.4.9.Kitinaz enziminin kinetiğinin belirlenmesi

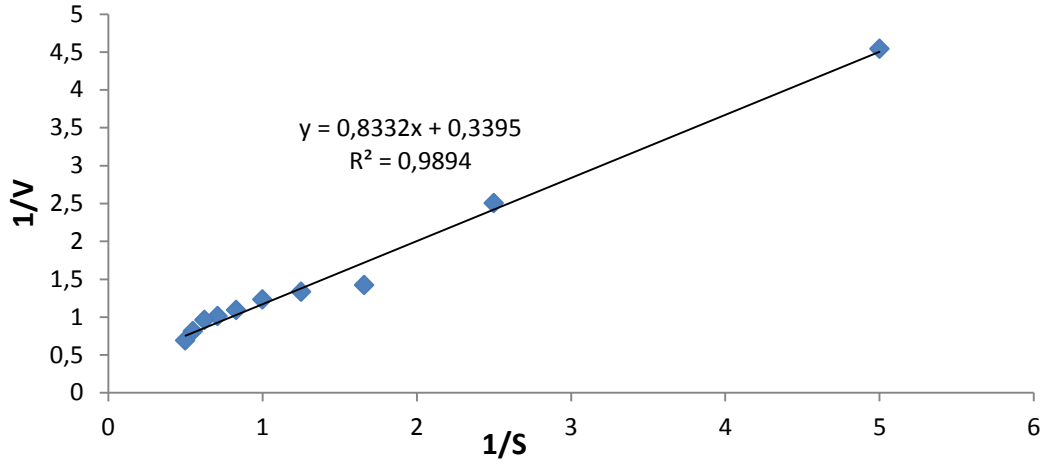
Kısmi saflaştırılmış kitinaz enziminin koloidal kitine olan ilgisinin araştırılması sonucunda (Çizelge 4.3) elde edilen grafiğin eğiminden Michaelis Menten eşitliğinde kullanılarak Km ve Vmax sabitleri bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Lineweaver-Burke grafiği için ham veriler

Koloidal kitin Substrat konsantrasyonu (mg/ml)	Aktivite (ünite) (V)	1/S	1/V
0.2	0.22	5	4.54
0.4	0.40	2.5	2.5
0.6	0.70	1.66	1.42
0.8	0.75	1.25	1.33
1	0.81	1	1.23
1.2	0.91	0.83	1.09
1.4	0.99	0.71	1.01
1.6	1.04	0.625	0.96
1.8	1.22	0.55	0.81
2	1.43	0.5	0.69

$$(1/V) = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) * \left(\frac{1}{S}\right) + \left(\frac{1}{V_{max}}\right)$$

Denkleminde veriler yerine konduğunda Şekil 4.17.'deki Lineweaver- Burk Grafiği elde edilmiştir.



Şekil 4.17. Kitinaz enziminin Lineweaver- Burk Grafiği

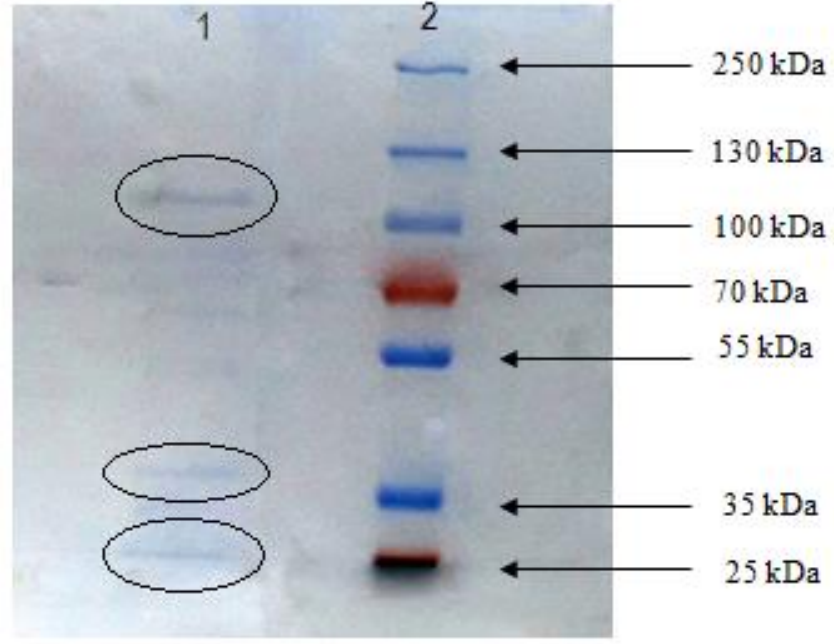
$R^2 = 0.9894$  değeri, grafiğin doğruluğunun anlamlı olduğunu göstermektedir.

$y=0.8332x+0.3395$  denklemini kullanılarak  $1/V_{\max} = 0.33$  ve  $V_{\max} = 2.94$  mM/dakika  $K_m / V_{\max} = 0.8332$  olduğundan  $K_m = 2.45$  mM olarak bulunmuştur.

Her enzimin  $K_m$  ve  $V_{\max}$  değerleri farklıdır.  $K_m$  değeri enzimin substrata olan ilgisi ile alakalıdır.  $K_m$  değeri arttıkça enzimin substrata olan ilgisi azalır.

#### 4.4.10. SDS poliakrilamid jel elektroforezi

Amonyum sülfat ile kısmi olarak saflaştırılan enzim karışımının SDS ile %12'lik yürütme jelin moleküler boyutu belirlenmiştir. Şekil 4.18.'de kitinaz enziminin SDS görüntüsü verilmiştir. Bu karışımında ~25kDa, ~37kDa, ~110 kDa büyüklüklerinde 3 adet band belirlenmiştir.



Şekil 4.18. Kitinaz enziminin SDS görüntüsü 1.Amonyum sülfat çöktürme sonrası 2. Marker

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kitin, mantar hücre duvarının önemli bir yapısal bileşeni olduğundan, kitinaz üreten mikroorganizmaların, bitkilerin farklı mantar hastalıkları için biyokontrol ajanı olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür. Biyolojik kontrol için kitinolitik mikroorganizmaları kullanmak, tarımsal fitopatogenleri kontrol etmek için alternatif bir strateji sunar.

Bu çalışmada yüksek miktarda ve yüksek aktivitede mikrobiyal kaynaklı kitinaz enzimin üretilmesi ve fitopatogen olan bazı funguslar üzerindeki etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Üretilen kitinaz enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen enzimin geniş spektrumlu pH, sıcaklık verileri enzimin doğada kullanılabilir olduğunu göstermiştir. Enzim aktivitesinin yüksek olması daha az üretimle daha çok işlem yapılabileceğini göstermiştir.

Antifungal denemelerde 7 adet mantar türü kullanılmıştır. Kitinaz enzimi bunlardan 4 tanesi üzerine antagonistik etki göstermiştir. Antifungal çalışmalarda kitinaz enziminin funguslar üzerindeki etkisini araştırırken *A. niger*, *Phytophthora*, *Sclerotinia* üzerinde bir inhisyona neden olmadığı görülmüştür. Bu çalışmalarda sonuç alınmamasının nedenleri arasında kitinaz enziminin fungusların büyüdüğü 30 °C'de stabilizasyonun kısa süreli olmasının yer alabileceği düşünülmüştür. Onun dışında bu türlerdeki hücre duvarında yer alan kitinin yapısı nedeniyle de inhibisyon gerçekleşmemiş olabilir. Bu nedenle adı geçen fungusların hücre duvarındaki kitinlere ilişkin detaylı bir çalışma yapılması gerekmektedir.

Yapılan moleküler klasifikasyon sonucunda kitinaz üreticisi izolatın *Aeromonas* türü olduğu belirlenmiştir. *Aeromonas caviae*, *Aeromonas* cinsinin mezofilik bir türüdür ve yaygın olarak sucul ortamlarda bulunan çevresel bir tür olarak bilinir. *A. caviae*'nin ayrıca, kitinolitik aktivitesiyle mantar patojenlerine karşı potansiyel bir biyolojik kontrol maddesi olduğu keşfedilmiştir (Inbar ve ark., 1991).

Inbar ve arkadaşlarının (1991), *Aeromonas caviae*'nin kitinazı ile yaptıkları çalışmalarda, saflaştırma sonucunda SDS PAGE analizlerinde üç tane band görmüşlerdir. Mokekül

ağırlığı 80 kDa olan bir tane güçlü band ile iki tane 48 ve 59 kDa olan iki tane zayıf band gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da ~25kDa, ~37kDa ve ~110 kDa boyutunda üç tane band olduğu görülmüştür. Ayrıca optimum pH'ı 6.0-7.0 belirlemişlerdir. Substrat afinitesini de bizim çalışmamızda da olduğu gibi en yüksek olarak koloidal kitine karşı bulmuşlardır ( Inbar ve ark., 1991). Mehmood ve arkadaşlarının (2009), *Aeromonas caviae* CB101 ile yaptıkları çalışmalarda kültür süpernatantında dört adet kitinaza restlamışlardır. Bunların moleküler büyüklüklerini 92, 82, 70 ve 55 kDa olarak bulmuşlardır (Mehmood ve ark., 2009).

Zhang ve arkadaşları (2014), *Aeromonas veroni*'nin kitinazı ile çalışmışlar ve optimum pH'nı 5.0 ve optimum sıcaklığını 50 °C olarak bulmuşlardır. Elde ettikleri kitinazı ticari kitinaz ile karşılaştırdıklarında karides kabuğu kitinini parçalamadığını görmüşlerdir. Parçalama için optimum enzim konsantrasyonunu 30 U olarak hesaplamışlardır. *Aeromonas veroni*'nin kitinaz genini *Pichia pastoris*'e aktarak çalışmışlar ve yüksek verim elde etmişlerdir (Zhang ve ark.,2014) .

Bazı *Aeromonas* türlerinin (*A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii*) insanlarda ve balıklarda patojenite içerdikleri bildirilmiştir. Bu nedenle bu türlerin endüstrideki kullanımları kısıtlanmaktadır. Bizim çalışmamızda da *Aeromonas* sp. BHC02 organizmamız patojen olabilme ihtimalinde kitinaz enzimini rekombinant olarak başka mikroorganizmalarda üretilebilir. Organizmanın potansiyel patojenlikleri, virülansla ilgili spesifik genler (*alt*, *act*, *ast*, *ahh1*, *aer*, *aerA*, *hlyA*, *ascV* and *ascFG*) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve kan agarı üzerinde hemolitik aktivite ile incelenebilir (Cardozo ve ark., 2017).

Watanabe ve arkadaşlarının (1992), yaptıkları çalışmalarda, *B. subtilis* kaynaklı kitinazın, bitki patojenleri, *A. niger*, *A. flavus* ve *P. chrysogenum*'a karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu belirtmişlerdir. *Streptomyces* sp.'den saflaştırılmış kitinaz, birçok bitki türünü etkileyen bir mantar olan *Botrytis cinerea*'nın hücre duvarına karşı antifungal aktivite göstermiştir. *B. cereus*' dan saflaştırılmış kitinaz, zambak yaprağı yanıklığının majör fungal patojeni olan *B. elliptica*'nın çimlenmesi üzerinde inhibitör aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *B. pumilus* suşu süpernatantından alınan

ekstraselüler kitinazlar, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium sp.*, *Nigrospora sp.*, *Stemphyllium botryosum* gibi bitki patojenlerine karşı antifungal aktivite göstermiştir.

Mach ve arkadaşları (1999), bakteriyel biyo-kontrol suşlarının, bitki patojen mantarlarını inhibe etmede kitinolitik enzimlerin etki ettiklerini göstermiştir. *Enterobacter cloacae* ile *Trichoderma harzianum*'ın kitinolitik enzimleri arasında güçlü bir sinerjizm belirlediler, kitinolitik enzimlerin bakteriyel büyümeyi ve fungal hiflere bağlanma yeteneklerini artırdıklarını buldular.  $\beta$ -glukanaz ile birleştirilen kitinazın fungal hücrelerin hızla ölümüne yol açtığını gözlemlemişlerdir. Fungal hücre duvarlarının hidrolizi üzerine  $\beta$ -1, 6-glukanaz ve *Trichoderma harzianum* kitinazının sinerjik etkisi de rapor edilmiştir ( Mach ve ark., 1999).

2013 yılında Debalina ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada elde ettikleri kitinazın *Fusarium graminearum* ve *Rhizoctonia solani* fitopatojenlerine karşı antifungal aktivitelerini belirlemişlerdir. Enzimlerinin optimum sıcaklığını 60°C ve pH'ını 7.0, enzimin moleküler ağırlığı 42 kDa bulmuşlardır. Bhushan ve arkadaşları (1998), *Bacillus sp.* kitinazını, yaygın olarak kullanılan fungusitler ve böcek ilacı ile karşılaştırmışlardır. Kitinaz, insektisitlerin aktivitesini artırabilir ve ayrıca gerekli kimyasalların konsantrasyonlarını en aza indirebilir olduğunu görmüşlerdir (Bhushan ve ark., 1998).

Zarei ve arkadaşları (2011), yapmış oldukları çalışmalarında *Enterobacter sp.*'in kitinazı çalışmışlar ve enzimin moleküler ağırlığını 54-60 kDa arasında olduğunu ve optimum sıcaklığının 45°C, optimum pH'ının 5 olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca koloidal kitin substratı kullanarak enzimin Km değerini 8.3 mg/ml  $V_{max}$  değerini 2.4 mmol/dk olarak hesaplamışlardır. Çalışmamızdaki kitinazın Km değeri 2.45 mg/ml  $V_{max}$  değeri 2.94 mM/dakika olarak bulunmuştur ve Zarei ve arkadaşlarını elde ettikleri kitinaza göre substrata olan ilgisini daha fazla olduğu görülmüştür.

Kitinaz enzimin aktivitesine bakılırken selüloz, kitin ve nişasta seçilmiştir. Bunların seçilmelerinin nedenleri DNS yöntemi ile indirgen şeker analizinin yapılmasıdır. Kısmi saflaştırılan enzim ile çalışıldığından, enzim karışımımızda diğer enzimlerin varlığının

bulunma ihtimaline karşılık aktivitelerini belirleme amacı güdülmüştür. Kitinaz enzimin karakterizasyonu sonucu elde edilen sıcaklık ve pH verilerinde geniş bir aralıkta aktif olduğu görülmüştür. Bu da enzimin kullanım yelpazesinin geniş olacağı anlamına gelmektedir.

Bitkilerin fitopatojenik mantarlar tarafından üretilen hastalıklardan korunması tarımdaki en önemli zorluklardan biridir. Bitki hastalıklarının sonucu olarak toplam kayıp, gelişmekte olan ülkelerde ekinin neredeyse % 50' sine ulaşmaktadır. Bunun üçte biri mantar enfeksiyonlarının bir sonucudur. Bu nedenle biyolojik mücadelede kullanılacak biyolojik ürünleri bulmak tarımda çok önemlidir. Son çalışmalar bitkilerden ve mikroorganizmadan gelen kitinazın mantar gelişimini engelleyebildiğini göstermiştir (Brzezinska ve ark. 2014).

Bu çalışmada, çeşitli fitopatojenlere karşı antifungal aktiviteye sahip doğal bir kitinaz izole edilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada izole edilen kitinaz, bitki zararlıları olan böceklerin biyolojik kontrolü gibi tarım üzerinde önemli etkilere sahip olabilir. Gelişen teknolojiyle birlikte mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin kullanım alanları ve önemleri büyük ölçüde artmıştır. Mikrobiyal enzimlerin birçok alanda kullanılmasının sebepleri arasında; kolay elde edilebilir olması, hızlı büyümeleri, daha ekonomik yollarla geliştirilmesi, yüksek aktivitede ve bol miktarda enzim sentezlemesi yer alır.

Elde ettiğimiz sonuçların endüstriyel açıdan önemine bakılırsa;

1. *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Penicillium*, *Botrytis cinerea* 'ya karşı antifungal aktivite gösteren ve kitinaz enzimi üretebilen organizmamız biyokontrol ajanı olarak tarımda kullanılabilir.
2. Üretilen kitinaz enzimi, funguslara karşı da fungusit olarak kullanılmaları mümkündür.
3. Üretilen kitinaz enziminin mantar enfeksiyonlarına karşı tıp alanında da uygulanabilirliği olabilir.
4. Üretilen kitinaz enziminin, doğada bol miktarda bulunan kabuklu deniz canlılarının kabuklarındaki kitini degrades etmesi sayesinde bu atık olan kabukların değerlendirilmesi ve çevre kirliliğinin önüne geçilmesi sağlanabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Basu, D. ve Chaudhuri, A., 2013. Purification and Characterization of chitinase from Thermophilic *Staphylococcus* sp., International Journal of Environmental Sciences, 4,4.
- Berkem, R., Türkoğlu, G., Yılmaz, S., Burcu, A. ve Kalkancı, A., 2016. *Fusarium solani*'nin Etken Olduğu Fungal Keratit Olgusu. Flora, 21, 33-37.
- Bhushan B., 1998. Isolation, purification, characterization and scale up production of a thermostable chitinase from an alkalophilic microorganism. Ph.D. thesis, Department of Microbiology, Chandigarh: Punjab University.
- Brzezinska, M. S., Jankiewicz. U., Burkowska, A. ve Walczak, M., 2014. Chitinolytic Microorganisms and Their Possible Application in Environmental Protection. Curr Microbiol., 68, 71–81.
- Cardozo, F., A., Gonzalez, J., M., Feitosa, V., A., Pessoa, A. ve Rivera, G., 2017. Bioconversion of  $\alpha$ -chitin into N-acetyl-glucosamine using chitinases produced by marine-derived *Aeromonas caviae* isolates. World J Microbiol Biotechnology, 33,201.
- Chang, W. T., Chen, M. L. ve Wang, S. L., 2010. An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as carbon source. World J. Microbiol. Biotechnology, 26, 945-950.
- Chanpen, W., Patcharapon, S. ve Amarat, B., 1999. Purification and characterisation of chitinase from *Bacillus circulans*. Current Microbiology, 39, 134-140.
- Cody RM., 1989. Distributin of chitinase and chitobiase in *Bacillus*. Curr Microbiol, 19, 201-205.
- Cody, RM., 1990. Screening Microorganisms for chitin hydrolysis and production of ethanol from amino sugars. Biomass, 21, 285-297.
- Coico R., 2005. Gram Staining. Curr Protoc Microbiol., 3.
- Dahiya, N., 2005. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern. Electronic Journal of Biotechnology, 8, 2.
- Eldin, A.M., 2009. Biochemical studies on microbial chitinases Department of Agricultural Biochemistry. Ph.D. thesis,
- Ernst, O. ve Zor, T., 2010. Linearization of the Bradford Protein Assay. *J. Vis. Exp.*, 38, 1918.
- Hamid, R., Khan, M., Ahmad, M., Ahmad, M., Abdin, Z. ve Javed, S., 2013. Chitinases: An update. J Pharm Bioallied Sci., 5, 21–29.
- Inbar, J. ve Chet, I., 1991. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne plant pathogens by this bacterium. Soil Biology and Biochemistry, 23, 973-978.
- Iseli, B., Armand, S., Boiler. T. ve Henrissat, B., 1996. Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. FEBS Lexters, 382, 186-188.
- Kirubakaran, S. I. ve Sakthivel, N., 2007. Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*. Protein Exp. Purific., 52, 159-166.
- Koç, E. ve Üstün, A., 2012. Phytophthora capsici Leon. ile enfekte edilen duyarlı ve dayanıklı biber genotiplerinin köklerinde antioksidatif tepkiler ve lipid peroksidasyonu. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 28(5),382-388.



- Kurandas, M. ve Robbins, W., 1991. Chitinase Is Required for Cell Separation during Growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 29.
- Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L. ve Di Pietro, A., 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83, 302-307.
- Macg, R., Zeilinger, S., Kulling, M., Lorito, M. ve Kubicek, P., 1999. Expression of Two Major Chitinase Genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is Triggered by Different Regulatory Signals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1858–1863.
- Mauch, F., Mauch Mani, B. ve Boller, T., 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue II: Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase. *Plant Physiol*, 88, 936-942.
- Mendonsa, E.S., Vartak, P.H., Rao, J.U. ve Deshpande, M.V., 1996. An enzyme from *Myrothecium verrucaria* that degrades insect cuticles for biocontrol of *Aedes aegypti* mosquito. *Biotechnology Letters*, 18, 373-376.
- Patel, JS., Vitoreli, A., Palmateer AJ., El-Sayed A., Norman DJ., Goss EM., Brennan MS. ve Ali GS., 2016, Characterization of *Phytophthora* spp. Isolated from Ornamental Plants in Florida. *Plant Dis.*, 100(2),500-509.
- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. ve Vorgias, C., 1994. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure*, 2, 1169-1180.
- Person, A. K., Chudgar, S. M., Norton, B. L., Tong, B. C. ve Stout, J. E., 2010. *Aspergillus niger*: an unusual cause of invasive pulmonary aspergillosis. *J Med Microbiol.*, 59, 834–838.
- Rattanakit N., Plikomol A., Yano S., Wakayama M. ve Tachiki T., 2002. Utilization of shellfish waste as a substrate for solid-state cultivation of *Aspergillus* sp. S1–13: evaluation of a culture based on chitinase formation which is necessary for chitin-assimilation. *J Biosci Bioeng*, 93, 550–556.
- Roberts, W.K, ve Seltrennikoff, C.P., 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gene Microbiol.*, 134, 169-176.
- Salo, M., Arbes, J., Sever, M., Jaramillo, R., Cohn, R., London, S. ve Zeldin, D., 2006. Exposure to *Alternaria alternata* in US homes is associated with asthma symptoms. *J Allergy Clin Immunol.*, 118, 892–898.
- Shubakov, A. ve Kucheryavykh, P.S., 2004. Chitinolytic Activity of Filamentous Fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 445-447.
- Stoscheck, C. M., 1990. Quantitation of protein. *Methods Enzymol*, 182, 50-68.
- Thamthiankul, S., Suan, S., Tantimavanich, S. ve Panbangred, W. 2001. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* sub.sp. pakistani. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 56, 395-401.
- Vad K., Neergaard E., Madriz-Ordenana K. ve Mikkelsen JD., 2003. Collinge DB: Accumulation of defence-related transcripts and cloning of a chitinase mRNA from pea leaves (*Pisum sativum* L.) inoculated with *Ascochyta pisi*. *Lib. Plant Sci* 92, 69–7.
- Vaidya, R.J., Shah, I.M., Vyas, P.R. ve Chhatpar, H.S., 2001. Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: potential in antifungal biocontrol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 691–696.

- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. ve Val'ero, J. R., 2007. Review : Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37, 1–20.
- Wang D., Li A., Han H., Liu T. ve Yang Q., 2018. A potent chitinase from *Bacillus subtilis* for the efficient bioconversion of chitin-containing wastes. *Int J Biol Macromol*, 116, 863-868.
- Wang, D., Shih, L., Liang, W. ve Wang, C. H., 2002. Purification and Characterization of Two Antifungal Chitinases Extracellularly Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a Shrimp and Crab Shell Powder, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2241-2248.
- Watanabe, T., Ito, Y., Yamada, T., Hashimoto, M., Sekine, S., ve Tanaka, H., 1994. The Roles of the C-Terminal Domain and Type III Domains of Chitinase AI from *Bacillus circulans* WL-12 in Chitin Degradation. *Journal of Bacteriology*, 176, 4465-4472.
- Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., Ohnishi, K., ve 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.
- Wesam I., Saber, A., Khalid M., ve Abdulaziz A., 2015. chitinase production by *Bacillus subtilis* ATCC 11774 and its effect on biocontrol of *Rhizoctonia* diseases of potato. *Acta Biologica Hungarica*, 66, 436–448.
- Williamson, B., Tudzynski, B. Ve Tudzynski, P., 2007, *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol.*, 8(5),561-80.
- Yanar, Y., 2005. Tokat İklim Koşullarında *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary'un *Sclerotium* Canlılığı Üzerine Solarizasyonun Etkisi. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22 (1), 15-19.
- Yuli, P. E., Suhartono, T. M., Rukayadi, Y., Hwang, J. K. ve Pyun, Y. R., 2004. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus sp.* *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 147– 153.
- Zarei, M., Aminzadeh, S., Zolgharnein, H., Safahieh, A., Noghabi, K. ve Ghoroghi, A., 2011. Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. *J. Microbiol.*, 42, 1017–1029.
- Zeman, N.W. ve McCrea, J. M., 1985.  $\alpha$ -Amylase Production Using a Recombinant DNA Organism. *Cereal Foods World*, 30, 777-780.
- Zentmyer, G.A., 1983. *Phytophthora*, its biology, taxonomy, ecology and pathology. APS Press, 1-7.
- Zhang, Y., Zhou Z., Liu, Y., Cao, Y., He, S., Huo F., Qin, C., Yao, B. ve Ringo E., 2014. High-yield production of a chitinase from *Aeromonas veronii* B565 as a potential feed supplement for warm-water aquaculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 1651–1662.

## 7. EKLER

EK 1: Amonyum sülfat çöktürme işleminde kullanılacak olan konsantrasyonlara göre madde miktarını gösteren tablo.

Table A.1 Amount of Ammonium sulfate required for protein precipitation.

Initial concentration of ammonium sulfate	Percentage saturation at 0°																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Solid ammonium sulfate (grams) to be added to 1 liter of solution																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Gülesme YILMAZ  
Doğum Tarihi ve Yeri : 22.07.1991 Kayseri  
Yabancı Dili : İngilizce  
Telefon : 05442913375  
e-mail : gulesmeyilmaz@gmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü	23.06.2014

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2017-2019	Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş.	AR-GE Mühendisi