

168329

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÜF MANTARLARINDAN KİTİNAZİN
İNDÜKSİYONU
VE KARAKTERİZASYONU

Kimyager Nurdagül ORHAN

F.B.E. Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İnci ARISAN ATAÇ

Doç. Dr. İnci Arisan

Doç. Dr. Aysegül Peksel

Prof. Dr. Refiye Yarıdağ

İSTANBUL, 2005

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	ii
KISALTIMA LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
ÇİZELGE LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KİTİN.....	3
2.1 KitininTarihçesi.....	4
2.2 Kitinin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	4
2.3 Kitinin Kristal Yapısı.....	6
2.3.1 Çözünürlük.....	6
2.4 Kitinin Enzimatik Biyosentezi.....	7
2.5 Kitinin Eldesi.....	9
2.6 Kolloidal Kitinin Hazırlanması.....	11
2.7 Kitin ve Türevlerinin Kullanım Alanları.....	11
2.7.1 Biyomedikal Uygulamalar.....	11
2.7.1.1 Anti-kanser Uygulamaları.....	11
2.7.1.2 Kontrollü İlaç Salınımı İle İlgili Uygulamalar.....	12
2.7.1.3 Yara İyileştirme ve Yanık Tedavisi.....	12
2.7.2 Çevre ve Kirlilik Kontrolü Uygulamaları.....	12
2.7.2.1 Ağır Metal, Boya ve Radyoaktif Atıkların Uzaklaştırılması.....	12
2.7.2.2 Atık Su İşlenmesi.....	13
2.7.3 Gıda İşleme Endüstrisi.....	13
2.7.4 Diğer Uygulamalar.....	13
3. KİTİNOLİTİK ENZİMLER.....	14
3.1 Kitinaz.....	14
3.1.1 Amino Asid Sıralarına Göre Kitinazların Sınıflandırılması.....	15
3.1.2 Kitinaz İle İlgili Uygulamalar.....	16
3.1.2.1 Bitki Patojenik Mantarların ve Böceklerin Biyolojik Kontrolü.....	17
3.1.2.2 Biyopestisidler İçin Bir Hedef Olarak Kullanımı.....	18
3.1.2.3 Kitoooligosakkaridlerin Üretimi.....	18
3.1.2.4 Çeşitli Uygulamalar.....	18
3.1.3 Kitinin Enzimatik Hidrolizi.....	19

4.	MATERYAL ve METODLAR.....	22
4.1	Materyaller.....	22
4.1.1	Kullanılan Aletler.....	22
4.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	23
4.2	Metodlar.....	24
4.2.1	Protein Miktarının Belirlenmesi	24
4.2.1.1	Total Protein Standart Eğrisinin Çizilmesi.....	24
4.2.2	Dinitrosalisilik Asid Metodu ile İndirgen Şeker Tayini.....	25
4.2.2.1	Çözeltiler.....	25
4.2.2.2	N-Asetilglukozamin Standart Eğrisinin Çizilmesi.....	25
5.	DENEYSEL ÇALIŞMA.....	28
5.1	Çalışmalarda Kitinaz Üretimi İçin Kullanılan Mikroorganizmaların Seçimi.....	28
5.2	Mikroorganizmaların Üretim Ortamları	28
5.3	Saf Kültürün Ekilmesi ve Saklama Koşulları.....	28
5.4	Spor Çözeltilisinin Hazırlanması.....	28
5.5	Çalışmada Kullanılan Enzim Üretim Ortamları.....	29
5.6	Ön Kültivasyon Ortamı.....	29
5.7	Yer Değiştirme Yöntemi.....	31
5.8	Kültür Ortamlarında Kitinaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi.....	31
5.8.1	Kitinaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması.....	31
5.8.2	Kullanılan Karbon Kaynağının Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması.....	31
5.8.3	Kitin Konsantrasyonunun Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması.....	31
5.8.4	Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Koşullarının Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması.....	31
5.8.5	Yer Değiştirme Yönteminin Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması.....	32
5.9	Trichoderma atroviride'den Kitinazın Karakterizasyonu.....	32
5.9.1	Sıcaklığın Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması.....	32
5.9.2	Ortamin pH'sının Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması.....	32
5.10	Enzim Aktivitesinin Hesaplanması.....	32
5.10.1	Protein Miktarının Hesaplanması.....	32
5.10.2	Total Ünitenin Hesaplanması.....	33
5.10.3	Spesifik Aktivitenin Hesaplanması.....	33
6.	SONUÇLAR.....	34
6.1	Kitinaz Üretimi İçin Kullanılan Mikroorganizmaların Seçimi.....	34
6.2	Aspergillus niger'de Kitinaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşullar.....	35
6.2.1	İnkübasyon Süresinin Kitinaz Üretimine Etkisi.....	35
6.2.2	Kullanılan Karbon Kaynağının Kitinaz Üretimine Etkisi.....	35
6.2.3	Kitin Konsantrasyonunun Kitinaz Üretimine Etkisi.....	35
6.2.4	Yer Değiştirme Yönteminin Kitinaz Üretimine Etkisi.....	36
6.3	Trichoderma atroviride'de Kitinaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşullar.....	43
6.3.1	Kitinaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması	43
6.3.2	Kullanılan Karbon Kaynağının Kitinaz Üretimine Etkisi.....	43
6.3.3	Kitin Konsantrasyonunun Kitinaz Üretimine Etkisi.....	43
6.3.4	Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Koşullarının Kitinaz Üretimine Etkisi.....	43
6.3.5	Yer Değiştirme Yönteminin Kitinaz Üretimine Etkisi.....	44

6.4	Trichoderma atroviride'den Kitinazın Karakterizasyonu.....	50
6.4.1	Sıcaklığın Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması.....	50
6.4.2	Ortaman pH'sının Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması.....	51
7.	TARTIŞMA.....	52
	KAYNAKLAR.....	55
	ÖZGEÇMİŞ.....	64



SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
δ	Gama



KISALTMA LİSTESİ

GlcN	Glukozamin
GlcNAc	N-asetilglukozamin
GlcNAc ₂	N-asetilkitobiyoz
GlcNAc-1-P	N-asetilglukozamin-1-fosfat
GlcNAc-6-P	N-asetilglukozamin-6-fosfat
PPi	Pirofosfat
UDP	Üridindifosfat
UTP	Üridintrifosfat



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Kitinin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.2 Sellülozun kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2.3 Kitosanın kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2.4 Kitin sentezinin şeması.....	8
Şekil 2.5 Karides kabuklarından kitinin eldesi.....	10
Şekil 3.1 Kitinin enzimatik hidrolizi.....	21
Şekil 4.1 Total protein standart eğrisi.....	27
Şekil 4.2 N-asetilglukozamin standart eğrisi.....	27
Şekil 5.1 Kolloidal kitin hazırlanması.....	30
Şekil 6.1 Kitinaz üretimi yönünden incelenen mikroorganizmalar.....	34
Şekil 6.2 Kolloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında <i>A.niger</i> 'in kitinaz indüksiyonu ve kitinaz aktivitesinin inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	37
Şekil 6.3 Kolloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında <i>A.niger</i> 'in kitinaz indüksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	37
Şekil 6.4 Kolloidal kitin içeren ve glukoz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında <i>A.niger</i> 'in kitinaz indüksiyonu ve kitinaz aktivitesinin inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	38
Şekil 6.5 Kolloidal kitin içeren ve glukoz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında <i>A.niger</i> 'in kitinaz indüksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	38
Şekil 6.6 Glukoz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında <i>A.niger</i> 'in kitinaz indüksiyonu ve kitinaz aktivitesinin inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	39
Şekil 6.7 Glukoz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında <i>A.niger</i> 'in kitinaz indüksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	39
Şekil 6.8 Glukoz ile desteklenen ortamlarda <i>A.niger</i> 'in kitinaz indüksiyonu ve kitinaz aktivitesinin inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	40
Şekil 6.9 Glukoz ile desteklenen ortamlarda <i>A.niger</i> 'in kitinaz indüksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	40
Şekil 6.10 <i>A. niger</i> 'de kolloidal kitin ile desteklenen ortamlarda inkübasyon süresinin kitinaz spesifik aktivitesine etkisi.....	41
Şekil 6.11 <i>A.niger</i> 'de farklı karbon kaynaklarının inkübasyon süresine (saat) göre kitinaz spesifik aktivitesine etkisi.....	41
Şekil 6.12 <i>A. niger</i> 'de farklı kitin türlerinin inkübasyon süresine (saat) göre kitinaz spesifik aktivitesine etkisi	42
Şekil 6.13 <i>A.niger</i> 'de yer değiştirme yönteminin inkübasyon süresine (saat) göre kitinaz spesifik aktivitesine etkisi.....	42
Şekil 6.14 Kolloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında <i>T. atroviride</i> 'nin kitinaz indüksiyonu ve kitinaz aktivitesinin zamana (saat) göre değişimi.....	45
Şekil 6.15 Kolloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında <i>T. atroviride</i> 'nin kitinaz indüksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	45

Şekil 6.16	Kolloidal kitin içeren ve glukoz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında <i>T. atroviride</i> 'nin kitinaz indüksiyonu ve kitinaz aktivitesinin inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	46
Şekil 6.17	Kolloidal kitin içeren ve glukoz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında <i>T. atroviride</i> 'nin kitinaz indüksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	46
Şekil 6.18	Kolloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenen ortamlarda <i>T. atroviride</i> 'nin kitinaz indüksiyonu ve kitinaz aktivitesinin inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	47
Şekil 6.19	Kolloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenen ortamlarda <i>T. atroviride</i> 'nin kitinaz indüksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.....	47
Şekil 6.20	<i>T. atroviride</i> 'de kolloidal kitin ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında inkübasyon süresinin (saat) kitinaz spesifik aktivitesine etkisi.....	48
Şekil 6.21	<i>T. atroviride</i> 'de farklı karbon kaynaklarının inkübasyon süresine (saat) göre kitinaz spesifik aktivitesine etkisi.....	48
Şekil 6.22	<i>T. atroviride</i> 'de yer değiştirme yönteminin inkübasyon süresine (saat) göre kitinaz spesifik aktivitesine etkisi.....	49
Şekil 6.23	İnkübasyon sıcaklığının <i>T. atroviride</i> tarafından üretilen kitinaz aktivitesine etkisi.....	50
Şekil 6.24	Ortamin pH'sının <i>T. atroviride</i> tarafından üretilen kitinaz aktivitesine etkisi.....	51

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Kitin elde edilen bazı organizmalar.....	3
Çizelge 4.1 Kullanılan kimyasal maddeler.....	23
Çizelge 4.2 Dinitrosalisilik asid yöntemi.....	26



ÖNSÖZ

Uzun ve yoğun bir çalışma sürecinin ürünü olan bu tezi hazırlarken her ne kadar zor ve yorucu günler geçirsem de bu tez benim için son derece eğitici ve faydalı bir çalışma oldu.

Tez çalışmam süresince çalışmamı yönlendiren, değerlendirilmesini sağlayan, her konuda bilgilendiren ve desteğini esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. İnci Arısan Ataç'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, beni yönlendiren ve destekleyen Yrd. Doç. Dr. Ayşegül Peksel'e teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman maddi, manevi desteğini esirgemeyen ve yanımda olan sevgili aileme özellikle en umutsuz anımda umudum olan en büyük yardımcılarımla kardeşlerim Canan ve Burak Orhan'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.



ÖZET

Kitinazlar [E.C.3.2.1.14], β -(1,4) bağı N-asetilglukozaminin lineer bir homopolimeri olan kitini hidrolizleyen enzimlerdir. Kitin; böceklerin kutikulasında, kabuklu hayvanların kabuklarında ve birçok mantarın hücre duvarlarında bulunur. Birçok *Trichoderma* ve *Aspergillus* türleri mantarsal bir konuk veya kolloidal kitin varlığında kitinaz, β -1,3 glukana gibi hidrolitik enzimleri salgılayan bir küf mantarıdır.

Çeşitli küf mantarlarını kitinaz üretimi yönünden incelemek ve bu küf mantarlarının optimum enzim üretim koşullarını belirlemek çalışmanın temel amacıdır.

Kitinaz üretimi yönünden patates-dekstroza agar ortamında geliştirilen *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningi* ve malt-agar ortamında geliştirilen *Aspergillus niger* incelendi. Enzim üretimi, Dana ve çalışma arkadaşları tarafından önerilen ortamda gerçekleştirildi. Bu küflerin spesifik kitinaz aktiviteleri hesaplandı. Bulgulara dayanarak *Trichoderma atroviride* ve *Aspergillus niger* ile çalışmaya karar verildi. Her iki küf mantarı için enzim üretim koşulları optimize edildi. *Aspergillus niger* için; %0,5 kolloidal kitin içeren ortamın pH'sı 5.0 olduğunda, yer değiştirme yöntemi uygulandığında ve kültürasyon 30°C'de 24 saat ve çalkalayıcı su banyosunda gerçekleştirildiğinde optimum koşullar elde edildi. *Trichoderma atroviride* için ise %0,1 kolloidal kitin içeren ortamın pH'sı 5.0'e ayarlandığında, yer değiştirme yöntemi uygulandığında ve kültürasyon 30°C'de 48 saat ve çalkalayıcı su banyosunda gerçekleştirildiğinde optimum koşullar elde edildi. Ayrıca *Trichoderma atroviride*'nin karakterizasyonu da gerçekleştirildi.

Kitinaz aktivitesi dinitrosalisilik asit yöntemi ile tayin edildi. Bu yöntem enzimatik hareketin bir sonucu olarak serbest bırakılan N-asetilglukozaminin konsantrasyonuna bağlı çalışmaktadır. Bir ünite kitinaz aktivitesi standart koşullar altında kolloidal kitinden bir dakikada 1 μ mol N-asetil- β -D-glukozamin oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

Yapılan çalışmaların sonucunda *Aspergillus niger* tarafından üretilen kitinazın enzim izolasyonu için yeterli olmadığı görüldü. Elde edilen bulgulara dayanarak bir mutant olan *Trichoderma atroviride* tarafından salgılanan kitinaz miktarının karakterizasyon ve izolasyon çalışmaları için yeterli miktarda olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kitin, kitinaz, karakterizasyon, indüksiyon, küf mantarları.

ABSTRACT

Chitinases [E.C. 3.2.1.14], are enzymes which hydrolyze chitin, a linear homopolymer of β -(1,4) linked N-acetylglucosamine. Chitin is found in the cuticles of insect, the shells of crustaceans, and the cell walls of many fungi. A lot of *Trichoderma* and *Aspergillus* species are fungi that produce hydrolytic enzymes such as chitinases, β -1,3 glucanases, in the presence of a fungal host or colloidal chitin.

The main aims of this study are to examine different fungi for chitinase production and to determine the conditions of optimum enzyme production of these fungi.

Trichoderma atroviride, *Trichoderma reesei*, and *Trichoderma koningi* maintained on potato-dextrose agar and *Aspergillus niger* maintained on malt-agar medium were examined for chitinase production. The enzyme production was carried out on medium which was proposed by Dana et al. The specific chitinase activity of these fungi were determined. Then *Trichoderma atroviride* and *Aspergillus niger* were chosen for this study. The conditions of enzyme production were optimized for each of them. It was shown that the chitinase production increased for *Aspergillus niger* when the pH of the medium, which contained %0,5 colloidal chitin, was adjusted to 5.0, the method of replacement was applied, and the cultivation was carried out at 30°C for 24 hours with rotary shaker. It was determined that the chitinase production increased for *Trichoderma atroviride* when the pH of the medium, which contained %0,1 colloidal chitin, was adjusted to 5.0, the method of replacement was applied, and the cultivation was carried out at 30°C for 48 hours with rotary shaker.

Chitinase activity was assayed by a dinitrosalicylic acid. This method works on the concentration of N-acetylglucosamine which is released as a result of enzymic action. One unit (U) of the chitinase activity is defined as the amount of enzyme that is required to release 1 μ mol N-acetyl- β -D-glucosamine per minute from of dry colloidal chitin solution under assay conditions.

At the end of this study it is shown that chitinase which produced by *Aspergillus niger* is not enough quantity for enzyme isolation. It is concluded that chitinase in quantity which secreted by *Trichoderma atroviride*, is a mutant, is enough for characterization and isolation of this enzyme.

Keywords: Chitin, chitinase, characterization, induction, fungi.

1. GİRİŞ

Kitin, N-asetil-D-glukozaminin β -1,4 bağı, yüksek molekül ağırlıklı, çözünmez, lineer bir homopolimeridir ve doğada sellülozdan sonra en çok bulunan biyopolimerdir. Yengeç, istakoz, mollusk gibi deniz omurgasızlarının, böceklerin, kabukluların, eklembacaklıların, mantarların ve alglerin başlıca yapısal bileşenidir (Deshpande, 1986; Chen ve Chang, 1994; Wagner, 1994; Ilyina vd., 1995; Tanaka vd., 2003).

Kitin, glikozil hidrolazların 18. ve 19. ailesine ait olan kitinazlar ve 20. aileye ait olan kitobiyazlar tarafından parçalanır. Kitinolitik enzimlerden biri olan kitinazlar [E.C. 3.2.1.14] bakteriler, virüsler, yüksek bitkiler, hayvanlar ve insanlar gibi kitin içermeyen organizmaların yanı sıra mantarlar, kabuklular ve böcekler gibi çeşitli organizmalarda bulunmaktadır (Jolles ve Muzzarelli, 1999).

Kitinazlar, bitkilerde kitin içeren patojenlere karşı savunma sistemi olarak davranır. Bakteriler karbon ve azot kaynağı olarak kullandıkları kitinin asimilasyonu için kitinazlardan yararlanırlar. Filamentli mantarlar tarafından üretilen kitinazlar hücre duvarının çürütülmesi, sporların filizlenmesi, hifsel büyüme, hifsel otoliz, sporlarda farklılaşma, kitinin asimilasyonu ve mikoparazitlik gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Böceklerde tüy dökme işlemlerinde veya kitin içeren materyallerin hazmedilmesinde rol oynar. Kitinazlar, bazı tek hücreli hayvanlar tarafından, birçok selentere, nematod, yumuşakçalar ve eklembacaklıların sindirim sisteminin farklı doku bezleri tarafından sentezlenirler. Omurgalı hayvanlarda, bazı böcek yiyen kuşların ve memelilerin mide mukozası ve pankreasında da salgılanır. Bu kitinazların fizikokimyasal özellikleri ve enzimatik reaksiyonlarının mekanizmaları birbirlerinden farklıdır (Wu vd., 2001).

Kitinolitik enzimler; biyolojik pest kontrolünde, gıda ve yem endüstrisinde, gelişim faktörleri, tatlandırıcılar, tek hücre proteini üretimi için ve son olarak kitince zengin atık materyallerin parçalanması için anahtar bir rol oynarlar (Patil vd., 2000).

Biyolojik kontrol; bir organizmayı öldürmek veya kontrol etmek için canlı, başka bir organizmanın kullanılmasıdır. Biyokontrol sadece zararlı organizmaları hedef alan, hızlı bir şekilde yayılan suni bir salgın hastalık yaratır ve biyokontrol ajanı hedefini yok ettiğinde ölür [1].

Biyokontrol ajanları, bitki hastalığını baskılayan veya bitki gelişimini arttıran, bitki ilişkili, patojenik olmayan organizmalardır. Bazı bakteriler ve küf mantarları bitki patojenlerine karşı

biyokontrol ajanı olarak kullanılır. Bu işlem, mantarsal konukçunun hücre duvarının eritilmesini gerektirdiği için bu organizmalar tarafından salgılanan kitinaz ve β -glukanaz gibi hücre duvarı hidrolazları biyokontrol aktivitenin başlıca bileşenleri olarak gösterilmiştir (Kubicek vd., 2001).

Biyokontrolde mantarların kullanımı yeni bir fikir değildir. Bu olgu, 1800'lerin sonlarından 1900'lerin başlarına kadar geçen süreçte gelişti. Böceklerin ve yabancı otların kontrolünde mantarlardan yararlanmak için bazı çalışmalar yapılmıştır fakat kimyasal spreylerin daha ucuz ve etkin olması nedeni ile biyokontrol ajanları için yapılan araştırmalar zamanla azalmıştır. Buna karşın bu kimyasalların artan kullanımı, insanlara ve çevreye çok zararlı toksik bileşiklerin birikimi ve patojenlerin zamanla artan dayanıklılığının artması ile sonuçlanmaktadır. Bu ulusal ve küresel problemlerin üstesinden gelmek için kimyasal kontrole etkin alternatifler araştırılmakta ve antagonist organizmaların kullanımı (*Aspergillus* ve *Trichoderma* türleri gibi) umut verici yaklaşımlardan biri olarak görülmektedir (Cook ve Baker, 1983).

Çeşitli küf mantarlarını kitinaz üretimleri yönünden incelemek ve bu küf mantarlarının optimum enzim üretim koşullarını belirlemek çalışmanın temel amacıdır.

Yapılan çalışmaların sonucunda *Aspergillus niger* tarafından üretilen kitinazın enzim izolasyonu için yeterli olmadığı görüldü. Elde edilen bulgulara dayanarak bir mutant olan *Trichoderma atroviride* tarafından salgılanan kitinaz miktarının karakterizasyon ve izolasyon çalışmaları için yeterli miktarda olduğu sonucuna varıldı.

2. KİTİN

Kitin terimi Yunanca'da "Coat of mail" (örtü zırhı) anlamına gelen *Chiton* kelimesinden türemiştir. Çünkü kitin omurgasızlar için koruyucu bir tabaka olarak fonksiyon görmektedir (Gooday, 1990). Sistematik adı (1,4)-2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukan olan kitin, β -(1,4) bağlı N-asetil glukozamin kalıntılarından oluşmuş lineer bir polisakkariddir ve doğada sellülozdan sonra en bol bulunan ikinci biyopolimerdir (Deshpande, 1986; Chen ve Chang, 1994; Ilyina, 1995; Muzzarelli & Muzzarelli, 1998; Rudrapatman, vd., 2003; Tanaka, vd., 2003). Mercan ve denizanasını içeren zooplanktonlarının iskeletlerinin yanısıra yengeç karides ve ıstakoz gibi kabukluların kabuklarında bulunur. Kelebeklerin ve gelin böceklerinin kanatlarında bulunur. Maya, mantar ve diğer küf mantarları da hücre duvarlarında kitin içerirler (Sietsma ve Wessels, 1991; Tsigos ve Bouriotis, 1995). Dünya yüzeyinde kabuklu hayvanların, yengeçlerin, ıstakozların ve krillerin işlenmesinden oluşan katı atıklar kitinsel atıkların büyük bir miktarını oluşturur (Roy vd., 2003). Kitin başlıca deniz hayvanları tarafından yılda bir tondan fazla üretilmektedir. Yıllık sentezi 10^{10} - 10^{11} tondur (Blaak, 1993; Gooday, 1994; Muzzarelli, 1997).

Çizelge 2.1 Kitin elde edilen bazı organizmalar (Mathur ve Narang , 1990)

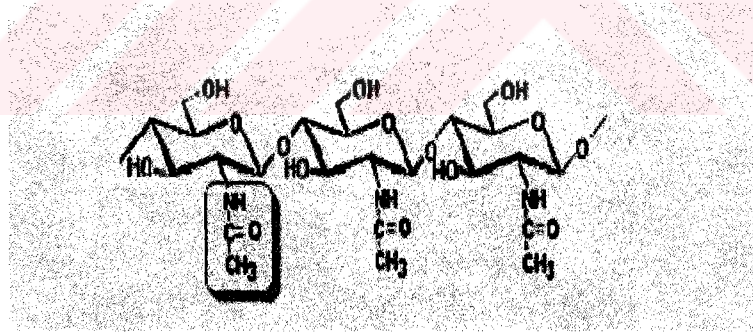
Omurgasızlar		Mikroorganizmalar
Deniz Hayvanları	Kara Hayvanları	Yeşil ve kahverengi algler
Annelid	Akrep	Küf mantarları
Mollusklar	Örümcek	Penicillium miselleri
Solenterler	Kolsu ayaklılar	Sporlar
Krustaseler	Karıncalar	
Istakozlar		
Yengeçler		
Karidesler		

2.1 Kitinin Tarihçesi

Kitin ilk olarak Fransa, Nancy'deki Bilimler Akademisi'nde Botanik Bahçe Müdürü ve Doğal Tarih Profesörü olan Prof. Henri Braconnot tarafından 1811'de bulundu. 1830'larda böceklerden izole edildi ve kitin olarak adlandırıldı. Prof. C. Rouget 1859'da kitosanı keşfetti ve sonraki yüzyılda birçok temel araştırma bu bileşikler üzerinde yer aldı. Yeni uygulamalarda artan ilgi 1930'larda ve 1940'ların başlarında gelişti. Gereken üretim araçlarının eksikliği ve sentetik polimerle rekabet gelişimi engelledi. 1970'lerde canlanan ilgi kabuklu balıkların kabuklarından daha iyi biçimde yararlanma ihtiyacı ile desteklendi. Dünya yüzeyindeki bilim adamları kitin ve türevlerini en farklı özelliklerini kayda geçmeye ve bu doğal polimerlerin potansiyelini anlamaya başladılar. Daha sonra bu materyallerin kullanımı için yöntem bulmaya yönelik çalışmalar yapılmaya başlandı.

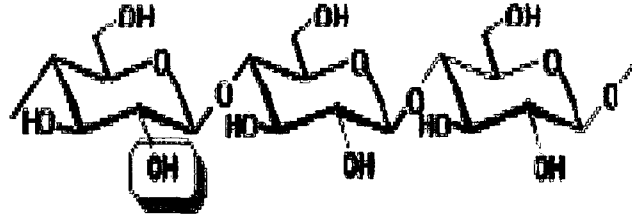
2.2 Kitinin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Kitin N-asetil-D-glukozamin (2-asetil-2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoz) ünitelerinin β -D (1-4) bağları ile bağlanmasından oluşmuş, yüksek molekül ağırlıklı lineer bir homopolimerdir (Revah ve Corrood, 1981; Tom ve Corrood, 1981; Limon, 2001).



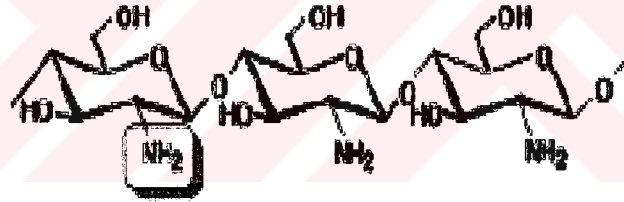
Şekil 2.1 Kitinin kimyasal yapısı.

Kitin birkaç milyon daltonluk büyük molekül ağırlığa sahip uzun zincirli moleküllerden oluşmuştur. Kitinin molekül yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Kitin çözünürlüğü ve düşük kimyasal reaktivitesi ile sellüloza benzeyen oldukça zor çözünen bir maddedir. Sellülozdaki iki numaralı karbona bağlı hidroksil grubunun asetamido grubu ile yerdeğiştirmesinin dışında kitin yapısal olarak sellüloza benzer (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Sellülozun kimyasal yapısı.

Kitinin N- de asetillenmiş formu olan kitosan de asetilasyon yolu ile kitinden türemiştir. Başka bir deyişle kitindeki asetamid grupları kitosanda amino gruplarına dönüşmüştür. Kitinin en yaygın kullanılan formudur. Zygomycetes gibi bazı mantarların hücre duvarları kitinin yanı sıra kitosan da içerir ve bunlar kitosan kaynağı olarak kullanılabilir (Muzzarelli, 1977; Roberts, 1992).



Şekil 2.3 Kitosanın kimyasal yapısı

Kitin toksik değildir ve N-asetilglukozamin kalıntılarından oluşmuş biyolojik olarak bozunabilen bir polimerdir (Simpson vd., 1994). Kitin suda ve bazda çözünmez fakat kuvvetli mineral asitlerde, susuz formik asidde (Knorr, 1984) heksafloroizopropanol, heksafloroaseton, kloroalkollerde ve %5 lityum klorür içeren dimetilasetamidde çözünür. Kitinin deasetillenmiş ürünü olan kitosan asetik asid, formik asid gibi çok seyreltik asitlerde çözünmez. Son zamanlarda kitosanın N-metilmorfolin-N-oksit içinde jelleşme yeteneği ve kontrollü ilaç salınımı formülasyonlarında uygulamaları bildirilmiştir. Zor koşullar altında derişik asidlerle kitinin hidrolizi sonucunda oldukça saf amino şekerler ve D-glukozamin meydana gelir.

2.3 Kitinin Kristal Yapısı

Kitin üç polimerik forma sahiptir. Bunlar kristal bölge içindeki zincirlerin farklı düzenlenmesi ile oluşan α , β ve γ kitindir.

α kitin, en fazla ve kolayca elde edilebilen formdur. Bu formda moleküller antiparalel bir şekilde sıralanır (Minke ve Blackwell, 1978; Blackwell vd., 1980). Bu moleküler düzen güçlü moleküller arası H bağları formasyonu için uygundur ve α kitin üç kristal formun en stabil olan şeklidir.

β kitinde moleküller paralel bir düzende toplanır, bu da daha zayıf moleküller arası güçlere sebep olur (Gardner ve Blackwell, 1975; Blackwell vd., 1980; Mazeau ve Winter, 1994).

Bu yüzden β kitinin α kitine göre daha az kararlı olduğu düşünülmektedir. Çözülme veya geniş şişkinlik halinde β kitin α kitine dönüşür fakat tersi söz konusu değildir (Rudall ve Kenchington, 1973). Sulu HCl de β kitinin α kitine dönüşümüne sebep olur. Morfolojik ve kristalografik incelemeler, interkristal biçim değişiminin asid derişimine bağlı olduğunu açığa çıkarmıştır (Saito vd., 1997).

α ve β kitinlerine nazaran γ kitin daha az bulunmaktadır. γ kitinin, α ve β formlarının bir karışımı veya ara formu olduğu düşünülmektedir. γ kitin hem paralel hem de antiparalel bir düzene sahiptir.

Farklı polimerik formlar farklı koşullar altında kullanılır. Örneğin α kitin aralarında en sert olanıdır ve eklem bacaklıların kutikulasında, mollusk, hidroza ve planktonlarda bulunur. Diğer taraftan β ve γ kitin, esnekliğin ve yumuşaklığın gerektiği yerlerde bulunur. Örneğin β kitin mürekkep balığının kollarında, mollusk, diatom (bir çeşit deniz algi), böcek dış kabukları ve kozalarda bulunur ve fungal hücre duvarının başlıca bileşenidir. β kitin daha az kararlıdır ve kitinin daha çok bozunabilen formudur. γ kitin mürekkep balığının mide duvarlarında bulunur (Zakkaria, 1997; Muzzarelli, 1999).

2.3.1 Çözünürlük

Kitin, güçlü intermoleküler hidrojen bağlarından dolayı çözücülere karşı çok dayanıklıdır. α kitin çözünür değildir fakat ağırlıkça % 5-10 lityum klorür içeren N,N-dimetilasetamid gibi özel çözücülerde ve hekzafloroaseton ve hekzafloro-2-propanol gibi bazı çözücülerde çözünür.

α kitinin inatçı doğasının tam aksine β kitin zayıf intermoleküler hidrojen bağlarından dolayı su ve organik çözücülere karşı daha fazla eğilim gösterir. β kitin, suda şişerek bulamaç haline dönüşür ve formik asidde bile çözünebilir.

Kitosan suda veya organik çözücülerde çözünmez. Kitosan poliamin olduğu için formik asid, laktik asid, asetik asid, oksalik asid gibi sulu asidlerde çözünür. Çözünürlüğün derecesi yoğunlaşmaya ve asidin tipine bağlıdır. Asidin yoğunluğunun yüksek olması çözünürlüğü düşürür. Bu yüzden fosforik asid, sülfürik asid, sitrik asid gibi bazı asidlerin sulu solüsyonları iyi çözücü değildir (Rutherford ve Austin, 1978).

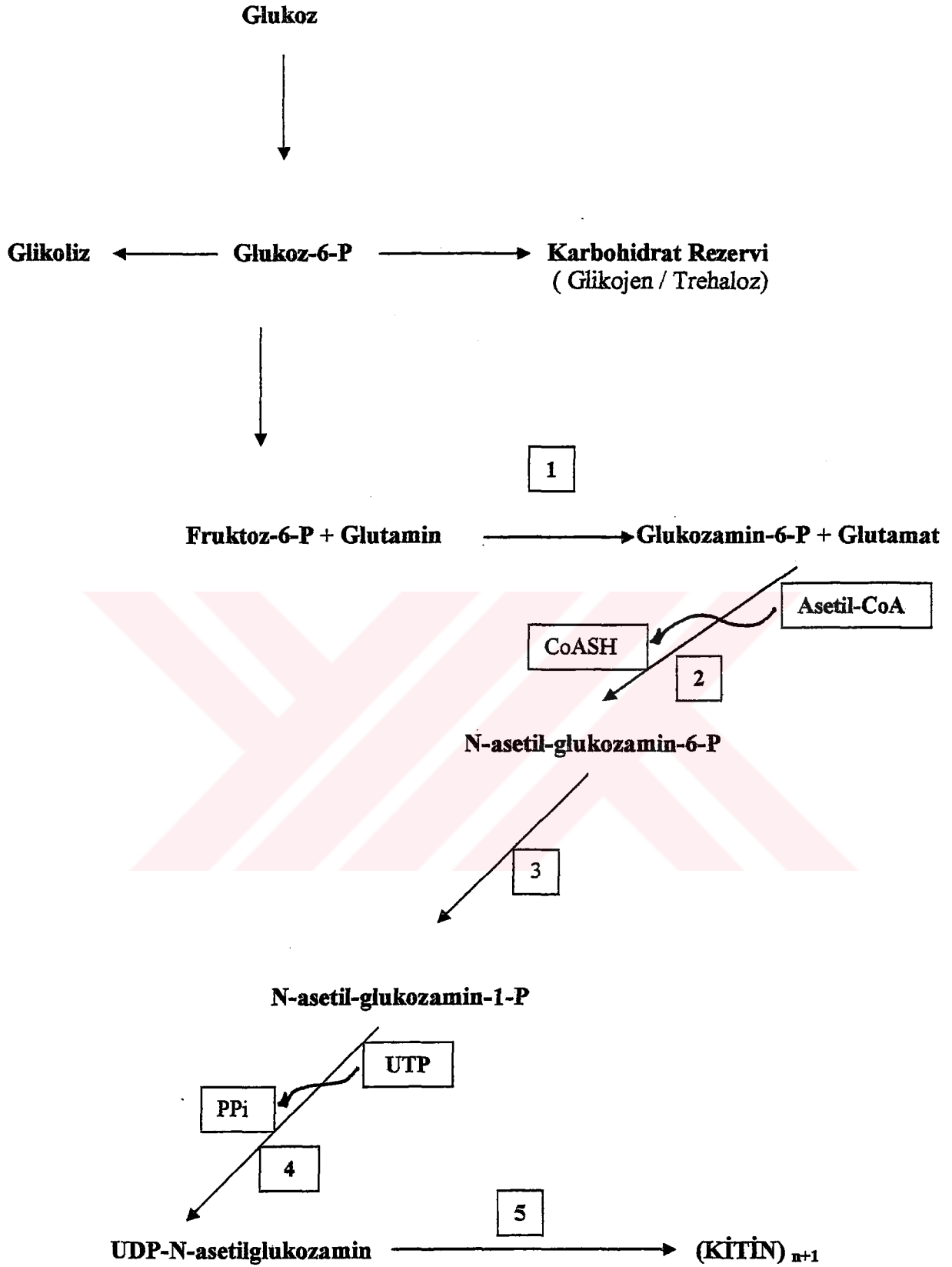
2.4 Kitinin Enzimatik Biyosentezi

Kitin mekanik dayanıklılığı ve karalılığı yüzünden ideal bir yapı metaryalidir ve bu yüzden eklembacaklı iskeletlerinde, mantarsal hücre duvarlarında ve nematod (bir omurgasız sınıfı) yumurtalarının kabuklarında çok sık bulunan genel statik bir bileşendir. Nitekim kitin sentezi eklembacaklılar ve küf mantarları ile sınırlı değildir. Hatta kitin sentezi yumuşakçalar sınıfından bir hayvan olan mollusklarda ve omurgalılarda bile yapılmaktadır (Wagner, 1994).

Kitin sentezi aktive edilmiş şeker vericileri olarak UDP-GlcNAc monomerlerini kullanan kitin sentaz enzimi [E.C.2.4.1.16] tarafından katalizlenmektedir (Glaser ve Brown, 1957). Bu enzim sadece Mg^{2+} , Mn^{2+} veya Ca^{2+} gibi iki değerli katyonların varlığında aktive olur (Merz vd., 1999).

Kitinin metabolik yolu beş adımdan oluşmaktadır. İlk olarak fruktoz- 6-fosfat ve glutamin, glutamin-fruktoz-6-fosfat amidotransferaz tarafından glukozamin-6-fosfat ve glutamine dönüştürülür. Diğer basamaklar Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Bu basamaklarda kullanılan enzimler aşağıda gösterilmiştir.

- [1] Glutamin-fruktoz-6-fosfat amidotransferaz
- [2] Glukozamin fosfat N-asetiltransferaz
- [3] Fosfo N-asetilglukozamin mutaz
- [4] UDP-N-asetilglukozamin pirofosforilaz
- [5] Kitin sentaz



Şekil 2.4 Kitin sentezinin şeması (Lagorce vd., 2002).

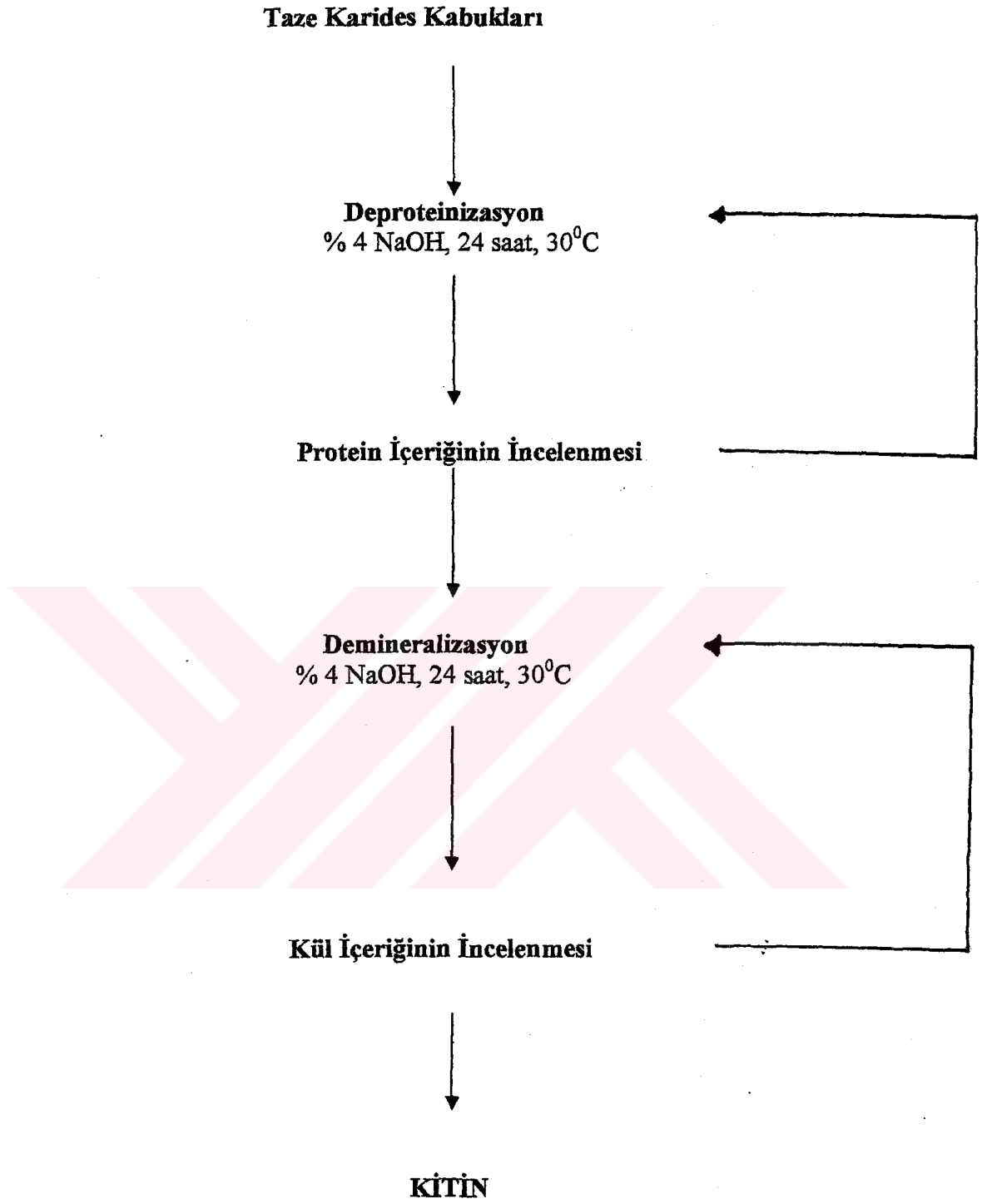
2.5 Kitinin Eldesi

α kitin, diğer iki ana bileşen olarak kalsiyum karbonat ve proteinleri içeren yengeç ve karides kabuklarından ticari olarak üretilmektedir (Şekil 2.5). Küçük miktarlarda pigmentler de içerir. Kitin, asit ve alkaliye karşı bu bileşenler arasında en dayanıklı maddedir ve sıradan çözücülerde çözünmez. Bu yüzden asit ve alkali ile kabukta bulunan diğer maddelerden ayrıştırılmasından sonra geriye kalan tortu olarak ayrılabilir.

Kalsiyum karbonatı uzaklaştırmak için kabuklar ilk önce oda sıcaklığında seyreltik HCl ile temizlenir ve muamele edilir. Sonra dekalsifiye edilmiş kabuklar proteinler ve pigmentleri ayrıştırmak için küçük parçalara bölünür veya ezilir ve yaklaşık 100° C'de 1-2 mol/lit. sodyum hidroksit içinde ısıtılır. Kitin kirli beyaza yakın hemen hemen renksiz toz bir madde olarak elde edilir. Burada asetamid gruplarının yanı sıra bazı serbest amino grupları da vardır. Proteazlar normal koşullar altında bazı proteinleri uzaklaştırmak için kullanılabilir.

Deminerilizasyon ve deproteinizasyon adımları herhangi bir sırada gerçekleştirilebilir. Eğer proteinin uzaklaştırılması isteniyorsa ilk önce deproteinizasyon adımı gerçekleştirilir. Bu yolda protein verimi ve kalitesi maksimumdur (No ve Meyers, 1997). Deminerilizasyon ve deproteinizasyon adımlarını takiben var olan pigmentler aseton veya hidrojen peroksit ile uzaklaştırılarak ürün renksizleştirilebilir. Bu adım istenen son ürünün özelliğine bağlı olduğu için gerekli değildir.

β kitin benzer ama daha basit bir şekilde mürekkep balığı peninden ayrılabilir, çünkü mürekkep balığı peni hemen hemen tamamen kitin ve proteinlerden oluşur. Çok az miktarda da metal tuzu içerir. Ayrıca β kitinin moleküler yapısı daha gevşektir. Normal koşullar altında kitini elde etmek için mürekkep balığı penleri HCl ve NaCl ile muamele edilir. Ayrılmış kitin ultrasantrifüjel değirmende ezildiğinde, beyaz, yumuşak, pamuk benzeri bir madde elde edilir. İzolasyon işlemi boyunca asetil gruplarının bazıları uzaklaştırılır (Kurita vd., 1993; Kurita, 1997a; 1997b).



Şekil 2.5 Karides kabuklarından kitin eldesi (Stevens, 1997).

2.6 Kolloidal Kitinin Hazırlanması

Kolloidal kitin olarak adlandırılan toz kitin, kitini parçalayan enzimleri tayin etmek için substrat olarak, kitini hazmeden mikroorganizmalar için karbon ve azot kaynağı olarak ve kitin çözünür olmadığından dolayı kimyasal reaksiyonlar için başlangıç materyali olarak kullanılır. Kolloidal kitin, sıcak, derişik HCl içinde veya o-fosforik asidde (%85) çözülmesi ve çözeltinin suya alınması ile hazırlanır (Smirnoff, 1977). Kitin tozsal bir maddeye dönüşür ve suda dağılabilir.

2.7 Kitin ve Türevlerinin Kullanım Alanları

Kitin ve türevleri (kitosan, kitin ve kitosan oligosakkaridleri) sahip oldukları özellikler sayesinde son yıllarda çok geniş uygulama alanı bulmuştur. Yapılan araştırmalar kitin ve kitosanın toksik ve alerjik olmadığını göstermiştir. Bu yüzden vücudun bu bileşikleri yabancı istilacı olarak görüp kabul etmemesi mümkün değildir. Kitinin biyolojik bozunması ve antifungal özellikleri çevresel ve tarımsal olarak kullanımlar için bir avantajdır. Kitosanın yükü de yağlara ve kolesterole bağlanmasına ve kırmızı kan hücrelerinin pıhtılaşmaya başlamasına yardım eder.

Aşağıdaki bölümlerde bahsedilen birçok uygulamalar henüz deneysel aşamadadır ve sadece birkaç ticari ürün marketlerde mevcuttur. Bununla beraber kitin ve türevlerinin endüstride çeşitli uygulamalar için onları uygun yapan çeşitli ilginç karakteristik görünüşleri yüzünden çok cazip görünmektedir.

2.7.1 Biyomedikal Uygulamalar

2.7.1.1 Anti-kanser Uygulamaları

Suda çözünebilen kitosan anti-kanser ajanı olarak kullanılmaktadır (Suzuki,2001). 5-floro urasilin kitin ve kitosan konjugatları tümörler için terapötik ajanlar olarak test edilmektedir. Kitin ve kitosan konjugatlarının, tümör hücrelerinin içinde seçimli olarak toplandığı ve yüksek bir tümör aktivitesi sergilediği bulunmuştur. Düşük toksiteleri yüzünden ve daha az bölge etkilerine sahip olması kitin ve kitosan konjugatlarını kullanmanın avantajlarıdır (Felse ve Panda, 1999).

2.7.1.2 Kontrollü İlaç Salınımı İle İlgili Uygulamalar

N- asetil glukozamin kalıntılarının altıncı karbonundaki hidroksil grubunda kitinin karboksil metilasyonu kitinin suda çözünürlüğünü ve biyo-bozunabilirliğini artırır. Kitinin çözünürlüğü ve biyolojik bozunabilirliğindeki artış uzun süreli salınım için ilaç taşıyıcıları olarak kullanımına olanak sağlamaktadır. Kitin ve kitosanı içeren dağıtım sistemleri özel zamanlarda ve bölgelerde ilaç salınımını kontrol için kullanılabilir (Felse ve Panda, 1999).

2.7.1.3 Yara İyileştirme ve Yanık Tedavisi

Kitin ve türevlerinin hem hücre bağlama hem de hücre aktivite özellikleri yüzünden yara iyileştirme işlemi üzerine hızlandırıcı bir etkiye sahip oldukları bulunmuştur (Olsen vd., 1997). Kitosan ayrıca yanık tedavisi için potansiyel bir bileşiktir. Kitosan; sağlam, su adsorplayan, biyolojik uyumlu filmler oluşturabilir. Bu filmler, uygulandığında soğuk bir sakinleştirici etkisi yaratan kitosan asetatın sulu çözeltisinin uygulanması ile yanık üzerine doğrudan yerleştirilebilir. Film aynı zamanda yüksek oksijen geçirgenliği de gösterir. Ayrıca kitosan filmleri su adsorplama ve uygulanmış filmi uzaklaştırmak gerektiğinde vücut tarafından doğal bozunma yeteneğine de sahiptir.

2.7.2 Çevre ve Kirlilik Kontrolü Uygulamaları

2.7.2.1 Ağır Metal, Boya ve Radyoaktif Atıkların Uzaklaştırılması

Deniz kabuklusu kitin ve kitosanı gibi doğal olarak bol bulunan biyosorbentler ağır metal iyonlarının, boyaların ve radyoaktif atıkların uzaklaştırılması için başarılı bir biçimde kullanılmaktadır. İçme suyundaki kurşun ve kadmiyumu uzaklaştırmak için kitosanın etkin biçimde kullanılabileceği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (FAOSTAT, 2001). Yengeç kabuklarının işlenmesi ile elde edilen kitosan elektrolitik kaplama endüstrisinden atık suların işlenmesi ve altı değerli krom iyonunun uzaklaştırılması için etkin biçimde kullanılmaktadır.

Kitin, kitosan ve hücre duvarlarında bulunan kitosan boyahanelerin atık sularından asidik boyaların uzaklaştırılması için etkin olarak kullanılmaktadır (Mc Kay vd., 1982). Boya uzaklaştırma işlemi bir iyon değiştirme mekanizması boyunca boyaların adsorpsiyonu ile meydana gelir. Kitin parçacıklarının fenolik boyaların uzaklaştırılmasında çok etkili oldukları bulunmuştur. Yapılan çalışmalar kitin partiküllerinin normalde kullanılan toprak minerallerinden 2,45 kez daha fazla boya adsorpladığını göstermiştir.

Ayrıca kitosan kirlenmiş yeraltı sularından uranyumun uzaklaştırılması için de kullanılmaktadır (Felse ve Panda, 1999).

2.7.2.2 Atık Su İşlenmesi

Kitosan katıların suspense edilmesi için en iyi bilinen pıhtılaştırıcıdır. Bu özelliği atık su işlenmesi için kitosanı ideal yapar (Meyers vd., 2000). Bu yüzden endüstriyel atık suların aydınlatılması için pıhtılaştırıcı ajan olarak kitosanın kullanılması şaşırtıcı değildir. Japonya'da üretilen kitosanın yaklaşık %85'i gıda endüstrisinde atık su işlenmesi için kullanılmaktadır (Oshima, 1998).

2.7.3 Gıda İşleme Endüstrisi

Gıda işleme endüstrisinde polisakkaridler gıdanın fonksiyonel özelliklerinin kontrolü veya değiştirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Polisakkaridler yiyeceklerde jelleştirme ajanları olarak yapı değiştirmek ve nem miktarını iyileştirmek için vb. birçok farklı amaçlar için kullanılır (Knorr, 1984). Hem kitin hem de kitosan polisakkarid formundadır ve yukarıda bahsedilen amaçlar için sık sık gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Gıdanın fonksiyonel özelliklerinin değiştirilmesine ek olarak çürükçül organizmanın gelişimini inhibe etmek için gıdaya kitosan da eklenebilir.

2.7.4 Diğer Uygulamalar

Yukarıda bahsedilen uygulamalardan başka kitin ve kitosan tarım endüstrisinde de kullanılmaktadır. Kitin ve kitosan ziraatte tohum iyileştirilmesi, nematosid ve yem içeriği olarak üç potansiyel kullanıma sahiptir. Gerçekleştirilen çalışmalar kitosanın, ürün verimini %50 kadar arttırdığını göstermiştir. Kozmetik endüstrisinde kitin ve kitosan tırnak cilası, banyo losyonu ve el kremi gibi birçok kozmetik ürünlerinde nemlendirici olarak kullanılmaktadır. Kitin kağıt yapımında da katkı olarak kullanılmaktadır (Chandrkrachang vd., 2001).

3. KİTİNOLİTİK ENZİMLER

Enzim Komitesi tarafından sadece iki kitinolitik enzim kabul edilmiştir. Bunlar; kitinaz [E.C.3.2.1.14] ve N-asetilglukozaminidaz [E.C.3.2.1.30]'dır (Bielka vd., 1984). Bir diğer kitinolitik enzim ise E.C. sayısına sahip olmayan kitobiyozydazdır. Birçok ökaryotik ve prokaryotik mikroorganizmalar bu enzim sistemlerini kullanarak kitinin bozunmasını katalizlerler (Cabib, 1987; Sahai ve Manocha, 1993).

Mikrobiyal kitinaz üretimi sadece geniş uygulama spektrumları yüzünden değil aynı zamanda etkin üretim metodlarının eksikliği yüzünden de hem endüstriyel hem de bilimsel çevrelerde dünya çapında ilgi odağı olmuştur (Nampoothiri vd., 2003). Kitinolitik enzimler biyolojik pest kontrolünde, büyüme faktörlerinin, tatlandırıcıların, tek hücre proteininin üretimi için gıda/beslenme endüstrisinde ve son olarak kitin içeriği zengin atık su materyallerinin degradasyonu için anahtar bir role sahiptir (Patil vd., 2000).

18. glikozil hidrolazlar ailesine ait olan kitinazlar (Cautinho ve Henrissat, 1999) insan, fare ve tavuk gibi omurgalıları, eklembacaklıları, nematodları, bakterileri, mantarları ve diğer küf mantarlarını içeren çeşitli kaynaklardan izole edilmektedir (Nagano vd., 2002; Suzuki vd., 2002).

Kitinin, serbest N-asetilglukozamine tüm enzimatik hidrolizi ekzokitinaz, endokitinaz ve kitobiyozydazdan oluşan bir kitinolitik sistem tarafından gerçekleştirilir. Bu kitinolitik sistemin sinerjik ve ardışık olduğu bilinmektedir (Vyas vd., 1989; Deshpande, 1986; Shaikh ve Deshpande, 1993).

Bitkilerden, böceklerden ve mikroorganizmalardan elde edilen kitinolitik enzimlerin rolleri ve uygulama alanları ile ilgili çalışmalar detaylı olarak incelenmektedir (Zikakis, 1989; Flach vd., 1992; Sahai ve Manocha, 1993; Gooday, 1995; Kombrink ve Somssich, 1995; Kramer ve Muthukrishnan, 1997).

3.1 Kitinaz

Sistematik adı poli- β -1,4-(2-asetamido-2-deoksi)-D-glukozid glukanohidrolaz olan kitinaz [E.C. 3.2.1.14] β -(1-4) glikozidik bağları ile bağlanmış N-asetil-D-glukozamin (N-asetil-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz) ünitelerinden oluşmuş yüksek molekül ağırlıklı lineer bir homopolimer olan kitinin parçalanmasından sorumlu olan hidrolitik enzimlerdir (Enzyme Nomenclature, 1965; Berkely, 1979).

Farklı organizmalar farklı substrat spesifikliğı ve çeşitli fonksiyonlar için uygun özellikler gösteren hidrolitik enzimlerin geniş bir aralığını üretirler.

Kitinazlar kitin eksikliği olan bitkilerde kitin içeren patojenlere karşı bir savunma sistemi olarak hareket eder (Wu vd., 2001). Bitki patojenlerine karşı koymak için bitkiler tarafından kullanılan en yaygın mekanizmalardan biri patojenezle ilgili proteinlerdir. Aralarında kitinazların da bulunduğu bu proteinler fitoparazit saldırılara karşı koymak için bitkilere yardımcı olurlar.

Filamentli mantarlar tarafından üretilen kitinazlar hücre duvarının çürütülmesi, sporların filizlenmesi, hifsel büyüme, hifsel otoliz, sporlarda farklılaşma, kitinin asimilasyonu (özümlemesi) ve mikoparazitlik gibi çeşitli fonksiyonlara sahipken bakteriler tarafından üretilenler besleyici veya yiyici bir role sahiptir (Gooday, 1990; 1997; Flach, 1992). Kitinazlar, bazı tek hücreli hayvanlar tarafından birçok selentere, nematod, yumuşakçalar ve eklembacaklıların sindirim sisteminin farklı doku bezleri tarafından sentezlenirler. Omurgalı hayvanlarda bazı böcek yiyen kuşların ve memelilerin mide mukozası ve pankreasında da salgılanır. Böceklerde tüy dökme işlemlerinde (Jeuniaux, 1961) veya kitin içeren materyallerin hazmedilmesinde rol oynar. Bu kitinazların fizikokimyasal özellikleri ve enzimatik reaksiyonlarının mekanizmaları farklıdır.

Kitinaz ilk defa 1911 yılında Bernard tarafından tespit edilmiştir. Bernard, aynı zamanda orkide özütünde ısıya duyarlı ve diffüze olabilen antifungal faktörü bulan kişidir. Daha sonraları 1929 yılında Karrer ve Hoffman salyangoz üzerinde yaptığı benzer bir çalışmada da aynı faktörü tespit etmiştir (Flach vd., 1992).

3.1.1 Amino Asid Sıralarına Göre Kitinazların Sınıflandırılması

Henrissat, glikozil hidrolazların amino asid sıralarına dayanarak kitinazları ve N-asetilhekzoaminidazları 18, 19, ve 20 olarak üç aileye ayırmıştır (Henrissat, 1991). 18. ve 19. ailelerin her ikisi bakteriler, küf mantarları, böcekler ve bitkiler gibi farklı kaynaklardan elde edilen endokitinazlardan oluşur. 19. aile ayrıca bitki kitinazlarını da içerir. *Vibrio harveyi*'den N-asetilglukozaminidaz [E.C.3.2.1.30] ile insan ve *Dictyostelium discoideum*'dan elde edilen N-asetilhekzoaminidaz [E.C.3.2.1.52] enzimleri 20. ailede bulunmaktadır. 1993'te Henrissat ve Bairoch 18. aileye ait olan *Flavobacterium* türlerinde bulunan endo-N-asetilglukozaminidaz [E.C.3.2.1.96] gibi enzimler üzerinde çalıştılar (Henrissat ve Bairoch, 1993).

Kitinaz gen sırasının bilinmesinin yardımıyla Perakis ve arkadaşları glikozil hidrolazların 18. ve 19. ailelerini temel alarak kitinazları Sınıf I ve Sınıf II olarak iki gruba ayırmayı denediler (Perakis vd., 1993).

Bitkiler, patojenlere karşı savunma yanıtı olarak çok fazla sayıda kitinaz izoenzimlerini üretirler. Amino asid dizilimlerine göre altı sınıfa ayrılmıştır (Iseli vd., 1996). Kitinaz sınıfları N-terminal sırası, enzim lokalizasyonu, izoelektrik pH, sinyal peptid ve indükleyicilerine göre belirlenir. Örneğin Sınıf I'e ait olan kitinazların özellikleri; sisteince zengin N-terminal, lösin ve valince zengin sinyal peptid ve hücre içindeki boşluklara yerleşmesidir (Flach vd., 1992). Kitinazlar bazik ve asidik yapılarına göre Sınıf Ia ve Sınıf Ib olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Sınıf I kitinazları sadece bitkilerde bulunurken Sınıf II kitinazları bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde bulunmaktadır. Sınıf II kitinazları patojen tarafından indüklenir ve sisteince fakir N-terminale sahiptir fakat Sınıf I kitinazları ile benzer amino asit sırasına sahiptir. Sınıf I kitinazlarının çoğu endo tiptir. Sınıf II kitinazları ise ekzotiptir. Bu hipotez için gösterilen kanıtlar henüz yetersizdir. Sınıf III kitinazları Sınıf I ve II'nin enzimleri ile benzer sıra göstermezler. Sınıf IV kitinazları ise immünolojik özellikleri yönünden Sınıf I kitinazlarına benzerler fakat onlardan daha küçüktürler (Collinge vd., 1993). Sınıf V ve VI kitinazları tek tip örnekler içerir. Amino asid dizilim bilgisine dayanılarak kitin bağlı (sisteince zengin) bölgenin yüksek bitkilerin evriminde bazen kaybolduğu görülmektedir.

3.1.2 Kitinaz İle İlgili Uygulamalar

Kitinazlar tarım ve endüstri alanında pek çok uygulamaya sahiptirler (Shaikh ve Deshpande, 1993; Zikakis, 1989).

3.1.2.1 Bitki Patojenik Mantarların ve Böceklerin Biyolojik Kontrolü

Birçok bitki türünde patojenin yerel istilası kitinazlar, β -1,3 glukanaazlar, proteazlar, proteinaz inhibitörleri gibi patojenez ile ilgili proteinlerin üretimini indükler (Kombrink ve Somssich, 1995). Böcekler ve patojenik küf mantarları dış kabuklarında kitin içerdikleri için bitkilerde kitinazların indüksiyonu başlıca savunma yanıtıdır. Bu kitinazların çoğu infeksiyon oluşumu ile vejetatif bitki organlarında indüklenir fakat tohumlarda da bir miktar kitinaz bulunur. Hadwiger ve Beckman, bezelye iç dokusunun (endokarp) ekstraktlarının kitinaz ve kitobiyaz aktivitesi içerdiğini göstermişlerdir (Hadwiger ve Beckman, 1980). Aslında bitki savunmasında bitki kitinazlarının yardımını göstermek için kitinaz aktivitesiyle savaşan fasülye pas mantarının (*Uromyces viciice-fabae*) hücre duvarındaki kitosan formasyonundan

daha iyi bir kanıt yoktur. Kitinazların çoğu tercihen yüksek biçimde deasetillenmiş substratları ayırırlar ve aktiviteler asetilasyon derecesindeki azalma ile düşer. Bu yüzden hifin yüzeyindeki deasetilasyon derecesindeki artış küf mantarlarının bitki kitinazlarına karşı koymalarında faydalı olabilir (Deising ve Siegrist, 1995).

Toprak bakterilerinin birçoğu da kitinolitik enzimler üretirler. Roberts ve Selitrennikoff enzim spesifikliği ve antifungal aktivite için bakteriyal ve bitki kitinazlarını incelemişlerdir (Roberts ve Selitrennikoff, 1988). Mısır, arpa ve buğday tohumlarından izole edilen kitinazların endo-kitinaz olarak fonksiyon gösterdiğini ve test mantarının hifsel uzamasını inhibe ettiğini bulmuşlardır. Aksine *S. marcescens*, *S. griseus* ve *Pseudomonas stutzeri* bakteriyal kitinazları ekzo-enzimler olarak davranırlar ve *T. reesei* ve *Phycomyces blackesleeanus* gibi test mantarlarının hifsel yayılması üzerine etkiye sahip değillerdir. Blaak ve arkadaşlarının ve Watanabe ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalar bu görüşü desteklemektedir (Blaak vd., 1993; Watanabe, vd., 1993). Nitekim Ordentlich ve arkadaşları yüksek kitinaz aktivitesi yüzünden *S. marcescens*'in varlığında fasulye tohumları üzerine *Sclerotium rolfsii* tarafından oluşturulan hastalığın daha yavaş geliştiğini gösterdi (Ordentlich vd., 1988). İlaveten Shapira ve arkadaşları *S. marcescens* kitinaz genini *E. coli*'de klonladılar ve sera koşullarında fasülyelerde *S. rolfsii*'nin ve pamukta *R. solani*'nin neden olduğu hastalığın oluş derecesini azaltmada etkin olduğunu buldular (Shapira vd., 1989). Ordentlich ve özellikle Shapira aleyhinde Roberts ve Selitrennikoff tarafından yapılan gözlemlerdeki bu aykırılık kullanılan test mantarlarındaki farklılıktan ve patojenik mantarın öldürülmesine yardımcı olan diğer faktörlerden kaynaklanabilir.

Birçok mantar türleri bitki patojenik mantarlara ve böceklerle karşı önemli biyokontrol ajanlarıdır. Mikoparazitik ve entomopatojenik mantarlar istila için ve konukçuyu öldüren bileşenlerden biri olarak kitinazları üretirler (Mathivanan vd., 1998; Kang vd., 1998; Higuchi vd., 1998).

Yer fıstığı pasının bir mikoparaziti olan *Fusarium chlamydosporum* suşu, *Puccinia arachidis* pas mantarının uredosporlarının filizlenmesini inhibe eden bir endo-kitinaz üretir. Bu olay yer fıstığı pasının biyokontrolünde kitinazın önemli bir katkısı olduğunu göstermektedir (Mathivanan vd., 1998). En fazla çalışılan mikoparazitik mantar olan *T. harzianum* kitinolitik enzimlerinin diğer kaynaklardan elde edilen enzimlerden daha geniş bir zararlı mantar aralığına inhibitör oldukları bulunmuştur (Lorito vd., 1993). *M. verrucaria* kitinaz, β -1,3 glukanaaz ve proteinaz gibi yüksek düzeyde ekstrasellüler mikolitik enzimleri üretir (Vyas ve Deshpande, 1989; Deshpande, 1998).

3.1.2.2 Biyopestisitler İçin Bir Hedef Olarak Kullanımı

Kitin, böceklerin dış kabuklarında ve gut astarlarında bulunur. Böcekte tüy dökme enzimi olan kitinaz *Bombyx mari*, *Manduca sexta* ve diğer bazı türlerde tanımlanmıştır. Benzer şekilde kitinaz, mantarın farklı morfojenetik evrelerinde bulunmaktadır (Villagomez-Castro vd., 1993). Yalancı trisakkarid olan allosamidin birçok kaynaktan elde edilen kitinazların önemli bir inhibitörüdür (Sakuda, 1996). Yine de kitinaz inhibitörleri önemli biyopestisidler olarak kullanım alanı bulmuşlardır.

3.1.2.3 Kitoooligosakkaridlerin Üretimi

Biyolojik biçimde aktif kito-oligosakkaridlerin potansiyel değeri giderek artmaktadır. Kito-oligosakkaritler bitki savunmasını meydana çıkaran maddelerdir ve tıpta önemli bir kullanım alanı vardır. Örneğin kitoheksoz ve kitoheptoz anti-tümör aktivitesi gösterir. *Vibrio alginolyticus*'dan kitinaz, koloidal kitinden kitotrioz ve kitopentoz eldesi için kullanılmaktadır (Murao vd., 1992). N,N'-diasetilkitobiyoz, biyolojik aktif bileşiklerin sentezi için başlatıcı madde olarak kullanılır (Terayama, 1993; Kobayashi vd., 1997).

GlcNAc, anti-inflamatuar bir ilaçtır. İnsan vücudunda glukozdan sentez edilir ve glikoproteinlere ve glikozaminoglikanlara bağlı olarak bulunur. Damar içinden (iv), kas içinden (im) ve hatta oral yoldan uygulanan GlcNAc'nin ülseratif kolitlerin ve diğer gastrointestinal inflamasyon bozukluklarının tedavisi için anti-inflamatuar bir ilaç olarak etkin olduğu bildirilmiştir (Friedman ve Skehan, 1980; Alosie vd., 1996). Aslında endo-kitinazların yüksek düzeyleri ve N-asetilglukozaminidaz ve ekzo-kitinazların düşük aktiviteleri ile kitinolitik enzimlerin spesifik kombinasyonu oligomerlerin istenen zincir uzunluğunu sağlamak için gerekli olmaktadır. Halbuki GlcNAc'yi elde etmek için ekzo-kitinaz ve Nasetilglukozaminidazın daha yüksek miktarları gerekmektedir (Alosie vd., 1996).

3.1.2.4 Çeşitli Uygulamalar

Mantarsal protoplastlar (asal hücreler) biyoteknolojik uygulamalar için suş ıslah programında ve mikolojik araştırmada artan önem kazanmaktadır (Peberdy, 1989; Gokhale, 1992; Lee vd., 1993). Mantarsal hücre duvarlarını eriten enzim kompleksinin en büyük bileşenlerinden biri kitinaz / kitosanazdır. Protoplast izolasyonu için çeşitli mikolitik enzimlerin tek başlarına veya kombine halde kullanılmaları yüksek kitinaz düzeylerinin etkin mantarsal miselya parçalanmasına olanak vermektedir (Vyas ve Deshpande, 1989; Kelkar vd., 1990).

N-asetilglukozaminidaz aktivitesinin sınırlı sayıda bakteride ifade edildiğinin bulunmasına karşı büyüme ortamına eklenmiş kitinin varlığında ve yokluğunda mantarlarda yaygın olarak N-asetilglukozaminidaz üretimi gözlenmiştir (Miller vd., 1998).

Tannaz adlı bir enzim gıda endüstrisinde istenmeyen tanenin (mazi tozu) uzaklaştırılmasında ve koruyucu olarak kullanılan gallik asidin üretimi için kullanılır. *Aspergillus niger* tarafından üretilen enzim, miselyuma güçlü biçimde bağlanır. Bu enzimin kimyasal ve fiziksel anlamda serbest bırakılması verimli değildir. Kitinaz kullanılarak hücre duvarlarının hidrolizinin tannazın geri kazanılmasında etkili olduğu bulunmuştur (Barthorneuf vd., 1994).

3.1.3 Kitinin Enzimatik Hidrolizi

Kitin kimyasal bozunmaya dayanıklıdır. Polimeri parçalamak için gereken çoklu reaksiyonlar yüzünden enzimatik olarak sindirilmesi zordur. Kitin kimyasal ve fiziksel parçalanmaya dayanıklı olduğu için mikroorganizmalar kitinin bozunmasında en büyük role sahiptir (Zobell ve Rittenberg, 1937; Gooday, 1994). Denize ait sedimentlerde neredeyse hiç serbest kitin bulunmaması bu mikrobiyal sistemlerin etkinliğinin bir göstergesidir (Zobell ve Rittenberg, 1937). Bu yüzden kitin deniz çevresindeki mikroorganizmalar için bir karbon ve azot kaynağıdır.

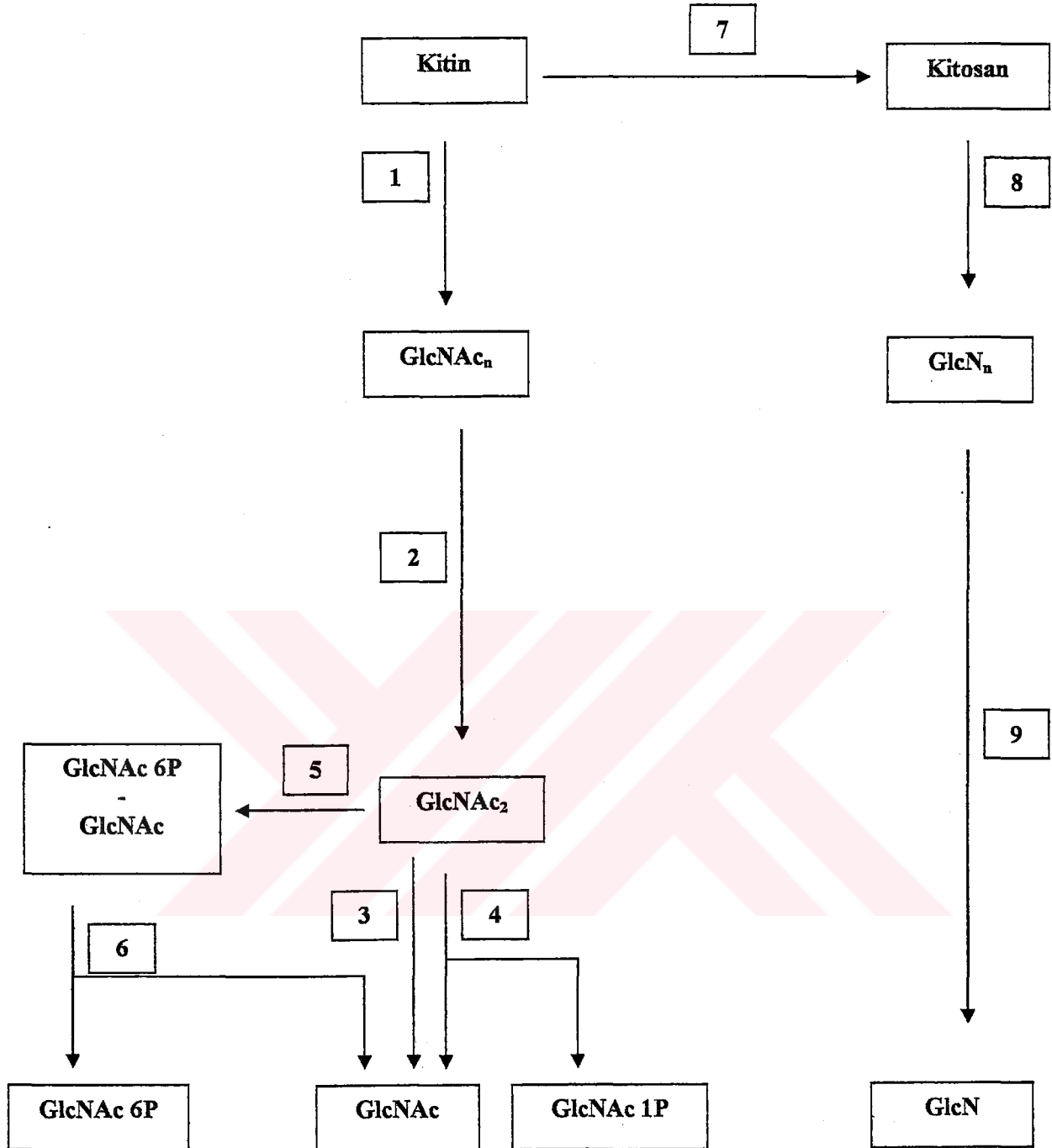
Deniz mikroorganizmaları tarafından kitinin bozunması ve metabolizması çeşitli ekstrasellüler kitin depolimerazları, katalitik olmayan kitin bağlı proteinleri, kitodekstrinazları ve periplazmik ve sitoplazmik N-asetilglukozaminidazları (kitobiyaz ve N-asetilhekzoaminidaz) içeren proteinlerin çok adımlı ardışık hareketinden oluşur.

Sellüloz ve kitin gibi polisakkaridlerin enzimatik hidrolizi çeşitli enzimlerin beraber hareketini gerektiren kompleks bir işlemdir. Genel olarak bu enzimler polisakkarid zincirini rasgele bir yerinden hidrolizleyen endo-enzimler ve zincirin ucuna yakın bir bölgede faal olan ekzo-enzimler olarak iki gruba bölünebilir. Enzimatik reaksiyonun yönü tipik olarak indirgen uç gruplarının konsantrasyonunu ölçen çeşitli kolorimetrik tayinlerin birinden yararlanılarak izlenir (Horn ve Eijssink, 2004).

Kitinin bilinen biodegradasyon yolu Şekil 3.1'de özetlenmiştir. Kitin endo ve ekzo tip kitinazların kombinasyonu ile GlcNAc dimerlerine (GlcNAc_2) parçalanırlar (reak. 1 ve 2). Daha sonra β -N-asetilglukozaminidaz (GlcNAcase ; reak. 3) dimer ünitelerini GlcNAc'ye hidrolizler veya kitooligosakkaridlerden GlcNAc ünitelerini ayırır (Gooday, 1994). Bazı organizmalar GlcNAc_2 ünitelerini GlcNAc_2 fosforilaz enzimi ile GlcNAc ve GlcNAc-1-fosfata

parçalar (reak. 4), (Park vd., 2000) veya bir GlcNAc₂ fosfotransferaz sistemi ile dimeri GlcNAc-6-fosfat- GlcNAc yapısına dönüştürür (reak.5). Bu yapı 6-fosfo-β-glukozaminidaz ile GlcNAc ve GlcNAc-6-fosfata parçalanır (reak. 6), (Keyhani ve Roseman, 1997; Keyhani vd., 2000). Kitinin degradasyonu için bir diğer yol ise kitinin kitin deasetilaz ile deasetilasyonudur (reak. 7). Deasetillenmiş kitin ve kitosan bir endo tip enzim olan kitosanaz (reak. 8) ve ekzo-β-D-glukozaminidaz (reak. 9) işbirliğinde glukozamine (GlcN) parçalanır (Gooday,1994).





Şekil 3.1 Kitinin enzimatik hidrolizi (Tanake, 2003).

4. MATERYAL VE METODLAR

4.1 Materyaller

4.1.1 Kullanılan Aletler

- ◆ Sterilizasyon işlemi için:

Fissler marka 10 litre hacimli düdüklü tencere

- ◆ Enzim üretimini sağlamak için yapılan çalışmada fermentasyon şartlarını sağlamak için:

Clifton ve Nüve marka çalkalamalı su banyosu

- ◆ Enzim aktivitesinin tayini için:

Philips PU 8740 UV/ VIS Spektrofotometre kullanılmıştır.



4.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Madde adı	Firma adı
Amonyum sülfat	LaChema
N-Asetilglukozamin	Sigma
Coomassie Blue G-250	Merck
Çinko sülfat hepta hidrat	Merck
Demir sülfat hepta hidrat	Merck
3,5-Dinitrosalisilik asit	Sigma
Etanol	JT Baker
Fenol	JT Baker
o- Fosforik asit (% 85’lik)	Merck
Kalsiyum klorür	Sigma
Kitin	Sigma
Magnezyum sülfat hepta hidrat	Riedel-de- Haen
Patates-dekstroz agar	Sigma
Pepton	Sigma
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Sakkaroz	Sigma
Sığır serum albümin	Sigma
Sitrik asit	Merck
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum-potasyum tartarat	Sigma
Sodyum sitrat	Sigma
Üre	JT Baker
Maya ekstarkti (Yeast extract)	Sigma

4.2 Metodlar

4.2.1 Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktar tayini standart olarak sığır serum albümin (BSA) kullanılarak Bradford Yöntemi'ne (1976) göre yapıldı.

Renk Reaktifinin Hazırlanması

100 mg Coomassie Blue G- 250, 50 ml %96 (v/v) etanolde çözüldükten sonra 100 ml %85 (v/v) o-fosforik asit eklendi. Destile su ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan bu renk reaktifi koyu renkli cam bir şişede saklanmalıdır.

4.2.1.1 Total Protein Standart Eğrisinin Çizilmesi

1 mg / ml konsantrasyon olacak şekilde BSA distile suda çözüldü. Bu çözeltiden 2-20 µg/ml konsantrasyon aralığında seyreltilmiş protein standartları hazırlandı.

1. Kuru, temiz test tüplerine 800 µl standart ve uygun şekilde seyreltilmiş örneklerden pipetlendi. Blank test tüpüne 800 µl destile su pipetlendi .
2. Tüplere 200 µl renk reaktifi eklendi.
3. Tüpler birkaç kez yavaşça karıştırıldı. 5 dk-1 saat aralığında köre karşı 595 nm'de absorbansları okundu.

Total protein standart eğrisini çizmek için standartların 595 nm'deki absorbans değerleri en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı. Hesaplanan absorbans değerleri ile protein konsantrasyonları arasında standart eğri çizildi (Şekil 4.1).

Çizilen standart eğrinin regresyon denklemi aşağıda verilmiştir.

$$y = 0,153363636 x + 0,1300801 \quad (4.1)$$

Standart eğriden örneklerin bilinmeyen konsantrasyonları okunarak % mg protein miktarları bulundu.

4.2.2 Dinitrosalisilik Asit Metodu İle İndirgen Şeker Tayini

Dinitrosalisilik asit (DNS) belirteci indirgen şekerin belirlenmesi için Sumner ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu belirteç 3,5-dinitrosalisilik asit, sodyum-potasyum tartarat (Rochelle Tuzu), fenol ve sodyum hidroksitten oluşur. Rochelle tuzu belirteci çözünmüş oksijenden korumak için, fenol renk miktarını arttırmak için kullanılır. Sodyum hidroksit ise DNS üzerine şekerin indirgeme hareketi için gereklidir (Miller, 1958).

4.2.2.1 Çözeltilerin Hazırlanması

Sitrat Tamponu:

0,1 M sitrik asit çözeltisi ve 0,1 M sodyum sitrat çözeltisi hazırlandı. 20,5 ml sitrik asit ve 29,5 ml sodyum sitrat çözeltileri karıştırıldı. Destile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu şekilde hazırlanan tamponun pH'sı 5'tir.

DNS Çözeltisi:

10 g 3,5-dinitrosalisilik asit; 10 g sodyum hidroksit; 2 g fenol ve 200 g sodyum-potasyum tartarat 1 litre destile suda çözüldü. Çözelti koyu renkli bir şişede saklanmalıdır.

Sonlandırma Çözeltisi:

2,5 M NaOH hazırlandı.

4.2.2.2 N- Asetilglukozamin Standart Eğrisinin Çizilmesi

Sitrat tamponu içinde %1'lik N-asetilglukozamin (GlcNAc) çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 0.004-0.5 mg/ml konsantrasyonlarında seyreltik GlcNAc standartları hazırlandı. Örnek olarak bu seyreltik çözeltilerin kullanılması ile her 24 saatte bir DNS metodu ile 540 nm'de aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen veriler en küçük kareler yöntemine göre düzenlendi. Absorbans ve N-asetilglukozamin konsantrasyonları arasında standart eğri çizilir.

Çizilen standart eğrinin regresyon denklemi aşağıda verilmiştir.

$$y = 1,32489022 x + 0,000010556$$

(4.2)

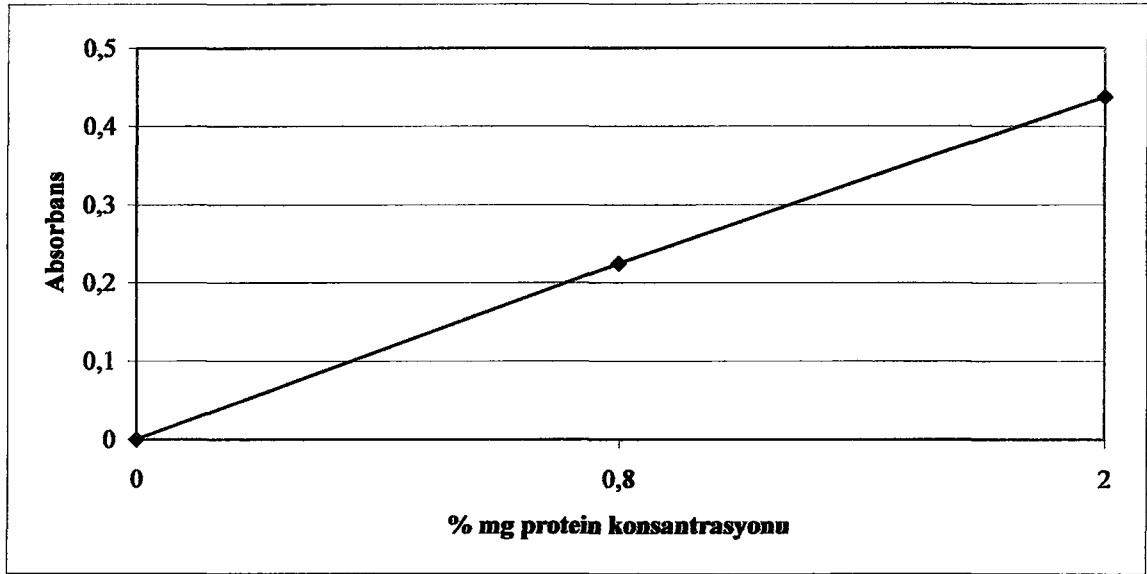
DNS yöntemi ile indirgen şeker tayini için yapılan deneme aşağıda anlatılmıştır.

1. Boş deneme ve örnek tüplerine substrat olarak 1000 µl %1 kolloidal kitin (Şekil 5.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan), 500 µl örnek eklendi. Kör tüpüne 1500 µl sitrat tamponu (pH=5) eklendi.
2. Boş deneme tüplerine 1000 µl 2,5 M NaOH eklendi.
3. Tüpler 30 dakika, 50°C'deki su banyosunda bekletildi.
4. Su banyosundan çıkarılan tüpler oda sıcaklığına erişince kör ve örnek tüplerine 1000 µl 2,5 M NaOH eklendi.
5. Bütün tüplere 3 ml DNS belirteci eklendi.
6. Tüpler 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi.
7. Oda sıcaklığına ulaşmış tüplere 15 ml destile su eklendi.
8. 540 nm'de köre karşı boş deneme ve örnek absorbanları okundu.

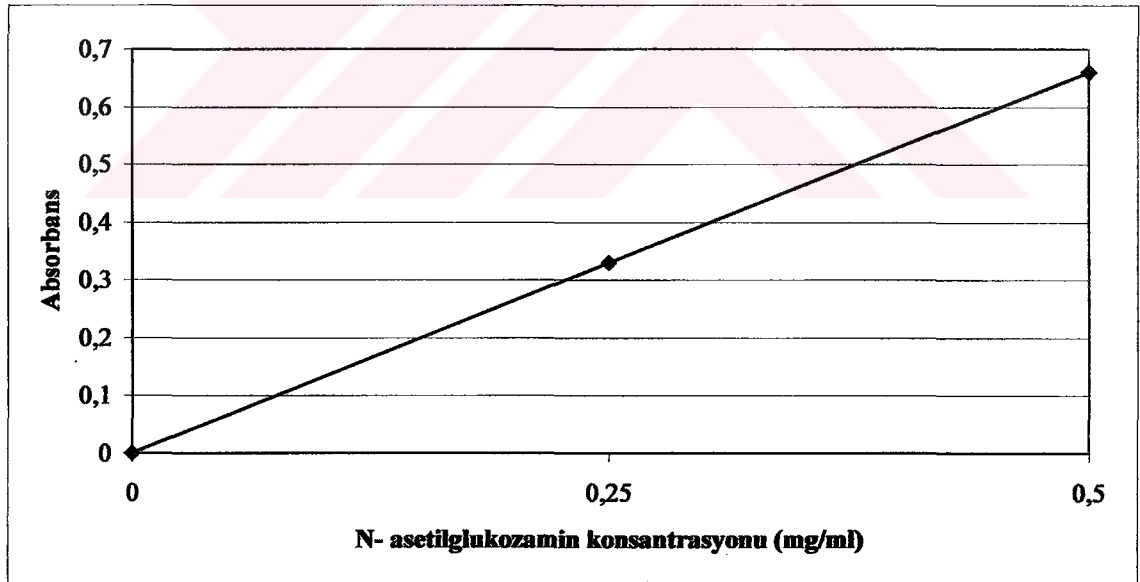
Örneklerdeki indirgen şeker miktarını bulmak için örnek ve boş deneme çözeltilerinin absorban farkına karşılık gelen değer standart N-asetil glukozamin eğrisinden okundu. Bu şekilde örneklerdeki N-asetilglukozamin miktarı (mg/ml) olarak bulundu.

Çizelge 4.2 Dinitrosalisilik asid metodu

KÖR	BOŞ DENEME	ÖRNEK
1500 µl sitrat tamponu (pH=5)	1000 µl %1'lik kolloidal kitin 500 µl örnek	1000 µl %1'lik kolloidal kitin 500 µl örnek
—	1000 µl 2,5 M NaOH	—
30°C'deki su banyosunda 30 dakika bekletilir.		
1000 µl 2,5 M NaOH	—	1000 µl 2,5 M NaOH
3 ml DNS Belirteci	3 ml DNS Belirteci	3 ml DNS Belirteci
5 dakika kaynayan su banyosunda bekletilir.		
15 ml destile su	15 ml destile su	15 ml destile su



Şekil 4.1 Total protein standart eğrisi.



Şekil 4.2 Standart N-asetilglukozamin eğrisi.

5. DENEYSEL ÇALIŞMA

5.1 Çalışmalarda Kitinaz Üretimi İçin Kullanılan Mikroorganizmanın Seçimi

Çalışmaların başlangıcında TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nden sağlanan *Aspergillus niger*, Viyana Teknik Üniversitesi, Biyokimyasal Teknoloji ve Mikrobiyoloji Enstitüsü'nden temin edilen *Trichoderma koningi*, *Trichoderma reesei* ve bu enstitü tarafından mutasyona uğratılmış olan *Trichoderma harzianum* P1 (*Trichoderma atroviride*) suşları incelenmiştir. Bu suşlarda sırasıyla 0,21 U/mg protein, 6,3 U/mg protein, 9,8 U/mg protein, 22,7 U/mg protein enzim aktivitesi saptanmıştır.

Çalışmanın sonraki aşamalarında, diğerlerine kıyasla daha yüksek aktiviteye sahip olduğu için *Trichoderma atroviride* ve daha önce çalışılmamış bir suş olduğu için *Aspergillus niger* kullanılmıştır.

5.2 Mikroorganizmaların Üretim Ortamları (Katı Besiyerleri)

Trichoderma suşlarının üretimi için 3,9 g patates-dekstroz agar (PDA) 100 ml destile su eklendi. Su banyosunda sürekli karıştırarak çözüldü ve 20 dakika 121°C buharlı basınçta sterilize edildi. Bu çözeltiden yaklaşık 16 ml steril petri kaplarına dökülüp, katılaşması için soğumaya bırakıldı.

Aspergillus niger'in üretimi için %3 malt ekstraktı ve %2 agar-agar 100 ml destile su ile manyetik karıştırıcıda karıştırken 10 ml metal kapaklı, steril cam tüplerin içine alındı ve 20 dakika 121°C buharlı basınçta sterilize edildi. Tüpler eğik biçimde tutularak katılaşması için soğumaya bırakıldı.

5.3 Saf Kültürün Ekilmesi ve Saklama Koşulları

5.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan katı besi yerlerine saf kültürler (suş) ekildi. 30°C 7 gün inkübe edildi. Bu süre sonunda yüzey tamamen sporlarla kaplandı. Bu şekilde hazırlanan suşlar (+) 4°C'de 3 ay saklanabilir. Daha uzun süre için kültürün yenilenmesi gerekir.

Herhangi bir kontaminasyondan sakınmak için bütün işlemler etanol ile dezenfekte edilmiş ortamda ve bek alevi yanında gerçekleştirildi.

5.4 Spor Çözeltisinin Hazırlanması

Katı besiyerinde yetiştirilmiş suşların üzerine 5 ml steril destile su ilave edildi. Ekim iğnesi yardımıyla sporlar kazınarak çözeltiye alındı.

5.5 Çalışmada Kullanılan Enzim Üretim Ortamları (Sıvı Kültür Ortamları)

Çalışmalarda iki farklı enzim üretim ortamı kullanıldı. I. enzim üretim ortamı Dana ve arkadaşları (2001) tarafından önerilen Sentetik Ortam (SM)'dir. *Aspergillus niger*'den kitinaz üretimini arttırmak için kullanılan II. enzim üretim ortamı ise Xia ve arkadaşlarının (2001) önerdiği ortamdır.

Sitoplazmanın esas maddeleri olan polisakkarid, lipid ve proteinlerin yapısında bulunan karbonun sağlanması için bütün mikroorganizmaların bir veya daha fazla karbon kaynağına ihtiyaçları vardır. Mikroorganizmalar karbon gereksinimlerini CO₂, karbonatlar ve çeşitli organik kaynaklardan sağlarlar. Azot kaynağı olarak amonyum tuzlarından yararlanırlar. Azot, mikroorganizmaların proteinlerin, nükleik asitlerin ve çeşitli enzimlerin yapısına girer. Ayrıca mikroorganizmalar çeşitli yapı maddelerinin ve enzimlerin yapılarına göre çeşitli minerallere gereksinim duyarlar. Bu minerallerin başlıcaları kükürt ve fosfordur. Çeşitli enzimlerin aktivasyonunda rol oynayan Mg⁺⁺, Fe⁺⁺, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, K⁺, Cl⁻ gibi iyonlar mikroorganizmaların beslenmesinde yer almaktadır (Bilgehan, 1999).

I. enzim üretim ortamı litrede 10 g sakkaroz veya glukoz; 1,4 g (NH₄)₂ SO₄; 0,3 g üre; 2,0 g KH₂PO₄; 0,1 g CaCl₂.6H₂O; 0,3 g MgSO₄.7H₂O; 0,005 g FeSO₄.7H₂O; 0,002 g ZnSO₄.7H₂O içerir. Ortamın pH'sı 1 N HCl ile 5.0'a ayarlandı.

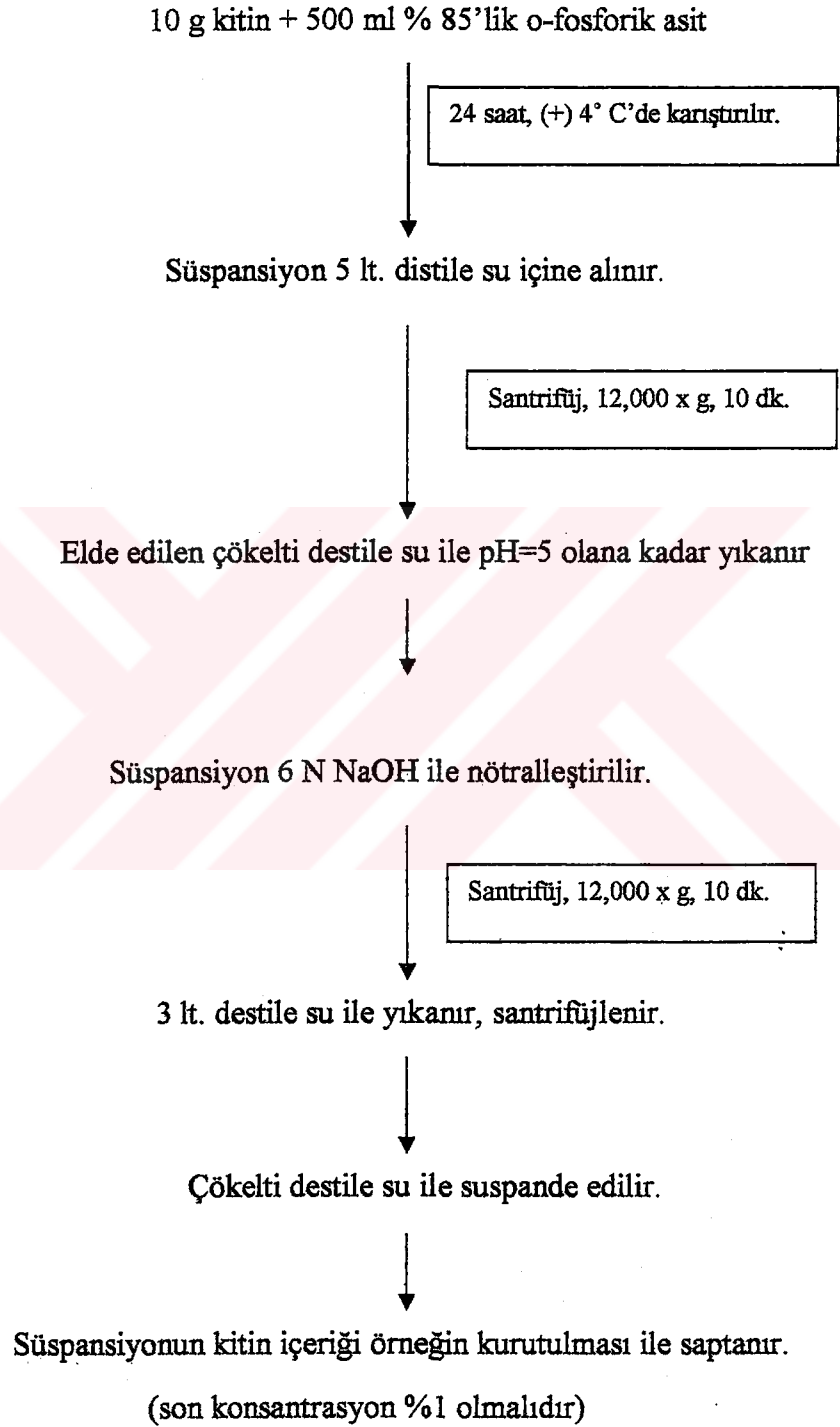
II. enzim üretim ortamı litrede 1 g glukoz; 0,5 g pepton; 0,5 g maya ekstraktı; 0,3 g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 0,01 g FeSO₄.7H₂O; 0,001 g ZnSO₄.7H₂O içerir. Ortamın pH'sı 1 N HCl ile 5.0'a ayarlandı.

Enzim üretim ortamları kullanılmadan önce 20 dakika 121° C buharlı basınçta sterilize edildi.

5.6 Ön Kültivasyon Ortamı

Herhangi bir kontaminasyon olmamasına dikkat edilerek, 100 ml enzim üretim ortamını içeren erlenlere 5.4'te anlatıldığı gibi hazırlanan spor çözeltisinden 0,5 ml eklendi. I. enzim üretim ortamını (Bölüm 5.5.) içeren erlenler çalkalamalı su banyosunda 30°C'de, II. enzim

üretim ortamını (Bölüm 5.5) içeren erlenler çalkalamalı su banyosunda 32°C'de 48 saat inkübe edildi.



Şekil 5.1 Kolloidal kitinin hazırlanması (Tanaka, et.all, 1999)

5.7 Yerdeğiştirme Yöntemi

5.6'da anlatıldığı gibi ön kültürasyona bırakılarak üretilen miseller süzüldü ve steril destile su ile iki defa yıkandı. Bu miseller %0,1 ve %0,5 kolloidal kitin (Şekil 5.1) içeren 100ml'lik taze hazırlanmış steril enzim üretim ortamlarına transfer edildi ve çalkalamalı su banyosunda 30°C'de veya 32° C'de inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte bir 5 ml'lik örnekler alındı.

5.8 Kültür Ortamında Kitinaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi

5.8.1 Kitinaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması

İnkübasyon süresinin kitinaz üretimine etkisinin saptanması için I. enzim üretim ortamında ön kültüre edilen *T. atroviride* ve *A. niger* miselleri süzülerek %0,1 ve %0,5 kolloidal kitin ile desteklenen I. enzim üretim ortamına aktarıldı. Daha sonra 30°C'de, çalkalamalı su banyosunda *T. atroviride* 24-96 saat, *A. niger* 24-72 saat sürelerde inkübasyona bırakıldı.

5.8.2 Kullanılan Karbon Kaynağının Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Karbon kaynağının kitinaz üretimine etkisini incelemek için enzim üretim ortamında %1 konsantrasyonda sakkaroz veya glukoz kullanılmıştır.

5.8.3 Kitin Konsantrasyonunun Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Çalışmalarda kullanılan enzim üretim ortamlarına %0,1 ve %0,5 olmak üzere iki farklı konsantrasyonda kolloidal kitin ilave edilmiştir. Ayrıca *A. niger* ile yapılan bir çalışmada %0,5 kolloidal kitinin ve %0,5 flake kitinin (pul biçiminde, ince parça kitin) enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir.

5.8.4 Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Koşullarının Kitinaz Üretimine Etkisinin

Saptanması

Çalkalamalı ve statik koşulların kitinaz üretimine etkisini araştırmak için ön kültüre edilmiş kültürler her iki koşulda da 30°C'de 48-96 saat süresince inkübe edildi.

5.8.5 Yer Değiştirme Yönteminin Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Yer değiştirme yönteminin kitinaz üretimine etkisini incelemek için kültürler hem yer değiştirme yapılarak hem de yer değiştirme yapılmaksızın aynı koşullarda kültive edilerek incelenmiştir.

5.9 *T. atroviride*'den Kitinazın Karakterizasyonu

5.9.1 Sıcaklığın Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Karbon kaynağı olarak %1 sakkarozun kullanıldığı, steril ön kültürasyon ortamına 0,5 ml *T. atroviride* spor çözeltisi ilave edilerek 25, 30, 35, 40 ve 50°C'de çalkalamalı su banyosunda 48 saat inkübe edildi. Oluşan miseller süzülerek iki kez steril destile su ile yıkandı. %0,1 kolloidal kitin ile desteklenen, taze hazırlanmış, steril enzim üretim ortamına alınan miseller 25, 30, 35, 40 ve 50°C'de çalkalamalı su banyosunda 48 saat inkübasyona bırakıldı.

5.9.2 Ortamın pH'sının Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

Karbon kaynağı olarak %1 sakkarozun kullanıldığı ön kültürasyon ortamının başlangıç pH'ları 0,1 N HCl ve 0,1 N NaOH kullanılarak 4 ile 7 arasında değişen değerlere ayarlandı. Steril edilen enzim üretim ortamlarına 0,5 ml *T. atroviride* spor çözeltisi ilave edilerek 30°C'de çalkalamalı su banyosunda 48 saat inkübe edildi. Oluşan miseller süzülerek iki kez steril destile su ile yıkandı. %0,1 kolloidal kitin ile desteklenen, aynı pH değerlerine sahip, taze hazırlanmış, steril enzim üretim ortamına alınan miseller 30°C'de çalkalamalı su banyosunda 48 saat inkübasyona bırakıldı.

5.10 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

1 ünite kitinaz aktivitesi (U); standart koşullar altında bir dakikada kitinden 1 µmol N-asetil-β-D-glukozamin oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı.

5.10.1 Protein Miktarının Hesaplanması

Şekil 4.1'deki total protein standart eğrisi kullanılarak bulunan %mg protein miktarları 100'e bölünerek ml'deki protein miktarı hesaplandı.

5.10.2 Total Ünitenin Hesaplanması

Şekil 4.2'deki standart N-asetilglukozamin eğrisi kullanılarak bulunan indirgen şeker miktarı aşağıdaki denklemde yerine yazılarak total ünite (U/ml) hesaplandı.

$$\text{Total Ünite (U/ml)} = [(\text{mg indirgen şeker} / \text{ml} \times 1000) / (t \times M_G)] \quad (5.1)$$

- mg indirgen şeker / ml : örneklerin ve boş denemelerin absorbanları arasındaki farka karşılık gelen indirgen şeker miktarı
- t : inkübasyon zamanı (30 dk)
- M_G : serbest bırakılan indirgen şekerin (N-asetilglukozamin) molekül ağırlığı (221 g / mol)

5.10.3 Spesifik Aktivitenin Hesaplanması

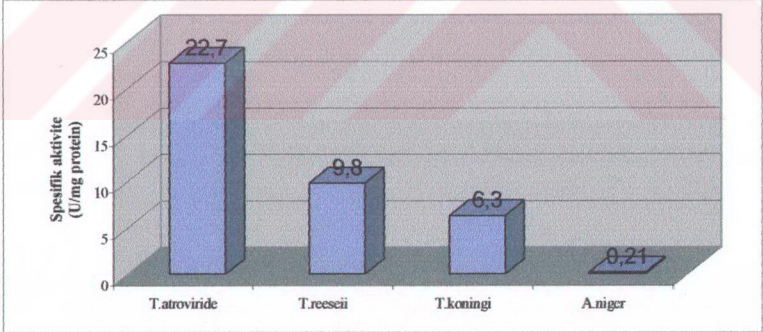
Total ünitenin ml'deki protein miktarına bölünmesi ile spesifik aktivite hesaplandı. Spesifik aktivite U/mg protein olarak verildi.

6. SONUÇLAR

6.1 Kitinaz Üretimi İçin Kullanılacak Mikroorganizmaların Seçimi

Bölüm 5.1’de anlatıldığı gibi temin edilen mikroorganizmalar kitinaz üretimi yönünden incelendi. Bu mikroorganizmalardan *Trichoderma koningi*, *Trichoderma reesei* ve *Trichoderma atroviride* patates dekstroza agarda, *Aspergillus niger* ise malt-agar katı besiyerlerinde (Bölüm 5.2) üretildikten sonra %1 sakkaroz içeren I. enzim üretim ortamında, 30°C’de, 48 saat ön kültivasyona bırakıldı. Oluşan miseller süzülerek iki kez steril destile su ile yıkandı. %0,1 kolloidal kitin ile desteklenen, taze hazırlanmış, steril enzim üretim ortamına alınan miseller 30°C’de çalkalamalı su banyosunda 48 saat inkübasyona bırakıldı.

Mikroorganizmaların kitinaz spesifik aktiviteleri saptandı (Şekil 6.1). Bulgulara dayanarak daha yüksek kitinaz aktivitesi gösteren *T. atroviride* çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. *A. niger* düşük kitinaz aktivitesi göstermesine rağmen hem daha önce üzerinde çalışma yapılmamış olduğu için hem de kitinaz aktivitesini iyileştirme açısından ele alınmıştır.



Şekil 6.1 Kitinaz üretimi yönünden incelenen mikroorganizmalar.

6.2 A. niger'de Kitinaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşullar

6.2.1 İnkübasyon Süresinin Kitinaz Aktivitesine Etkisi

Kitinaz üretimine *A. niger*'in inkübasyon süresinin etkisini araştırmak için yapılan çalışmalarda mantar sporları ekilen I. enzim üretim ortamı 24-72 saat arasında değişen sürelerde inkübe edildi. Her 24 saat sonunda alınan sıvı örneklerde total ünite (Şekil 6.2), protein (Şekil 6.3) ölçümleri yapıldı ve spesifik aktivite hesaplandı (Şekil 6.10).

Şekil 6.10'da görüldüğü gibi inkübasyonun 24. saatinde *A. niger*'in kitinaz spesifik aktivitesinin en yüksek olduğu saptandı.

6.2.2 Kullanılan Karbon Kaynağının Kitinaz Üretimine Etkisi

Sıvı besiyerinde ve enzim üretim ortamında karbon kaynağı olarak %1 sakkaroz veya %1 glukoz kullanılarak *A. niger*'in kitinaz üretimi incelendi. Her 24 saatte alınan örneklerde total ünite, protein ve spesifik aktivite ölçümü yapıldı. %1 sakkaroz içeren ortamın total ünite ve protein grafikleri Şekil 6.2 ve 6.3'te verilmiştir. %1 glukoz içeren ortamın total ünite ve protein grafikleri ise Şekil 6.4 ve 6.5'te verilmiştir. Şekil 6.11'de görüldüğü gibi karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı ortamda kitinaz aktivitesinin en yüksek olduğu saptandı.

6.2.3 Kitin Konsantrasyonunun Kitinaz Üretimine Etkisi

Şekil 5.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan kolloidal kitin %0,1 ve %0,5 konsantrasyonlarda *A. niger*'in I. enzim üretim ortamına substrat kaynağı olarak ilave edilmiştir. %0,5 kitin konsantrasyonu içeren ortamlarda kitinaz aktivitesinin en yüksek olduğu görüldü (Şekil 6.10).

Ayrıca %0,5 kolloidal kitin ve %0,5 flake kitin (ince tabakalar halinde, pul şeklindeki kitin) ile desteklenen II. enzim üretim ortamlarından her 24 saatte alınan örneklerde total ünite (Şekil 6.6) ve protein (Şekil 6.7) ölçümü yapıldı ve spesifik aktivite hesaplandı. %0,5 kolloidal kitin ile desteklenen ortamlardaki kitinaz aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 6.12).

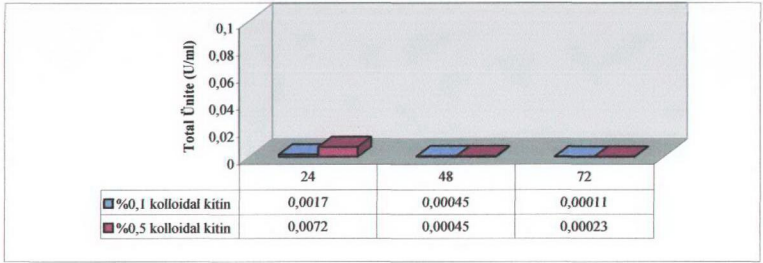
6.2.4 Yer Değiştirme Yönteminin Kitinaz Üretimine Etkisi

Karbon kaynağı olarak %1 glukoz kullanıldığında ve enzim üretim ortamı %0,5 kolloidal kitin ile desteklendiğinde inkübasyonun 24. saatinde *A. niger*'in kitinaz aktivitesinin en yüksek düzeye ulaştığı gözlemlendi. Bu aşamada yer değiştirme yönteminin kitinaz aktivitesine

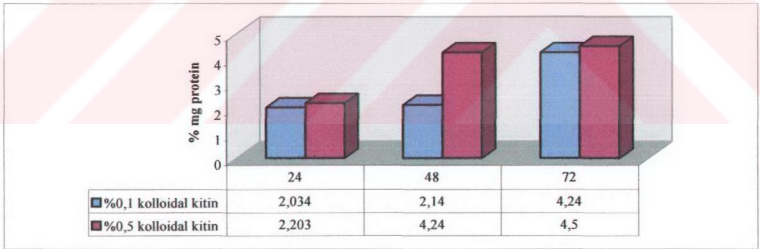
etkisini incelemek için Bölüm 5.5'te anlatılan II. enzim üretim ortamı kullanıldı. Ayrıca substrat olarak %0,5 kolloidal kitin ve %0,5 flake kitin kullanılarak bunların aktivitedeki etkileri incelendi.

Yer değiştirme yönteminin uygulandığı ve uygulanmadığı her iki denemeden alınan örneklerde total ünite ve protein ölçümleri yapıldı. Bu grafikler Şekil 6.6, 6.7, 6.8 ve 6.9'da verilmiştir. Kitinaz spesifik aktiviteleri hesaplandığında substrat olarak %0.5 kolloidal kitin kullanılan ve yer değiştirme yapılan ortamlarda kitinaz üretiminin arttığı görülmüştür (Şekil 6.13).



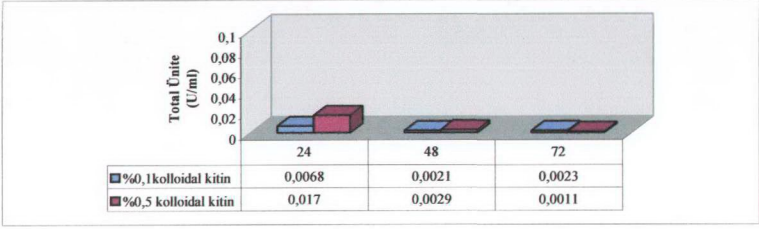


Şekil 6.2 Koloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında *A.niger*'in kitinaz indüksiyonu ve kitinaz aktivitesinin inkübasyon süresine (saat) göre değişimi

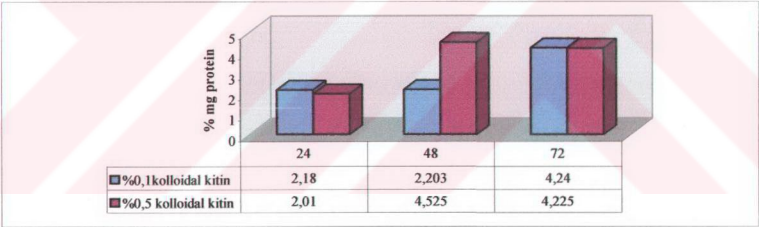


Şekil 6.3 Koloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında *A.niger*'in kitinaz indüksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.

Şekil 6.2 ve 6.3'te verilen değerler üç farklı çalışmanın ortalamasıdır.

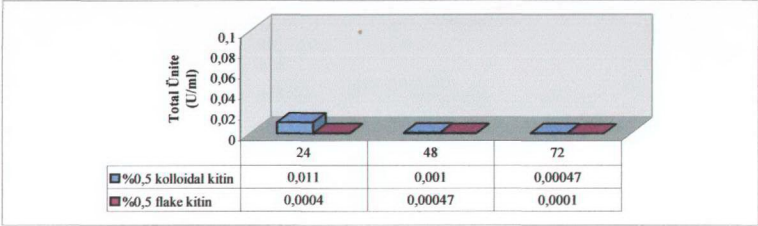


Şekil 6.4 Koloidal kitin içeren ve glukoz ile desteklenen yer değıştirme ortamlarında *A. niger*'in kitinaz indüksiyonu ve kitinaz aktivitesinin inkübasyon süresine (saat) göre değışimi

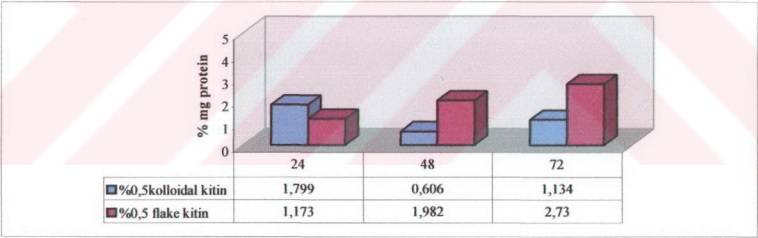


Şekil 6.5 Koloidal kitin içeren ve glukoz ile desteklenen yer değıştirme ortamlarında *A. niger*'in kitinaz indüksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değışimi

Şekil 6.4 ve 6.5'te verilen değerler üç farklı çalışmanın ortalamasıdır.

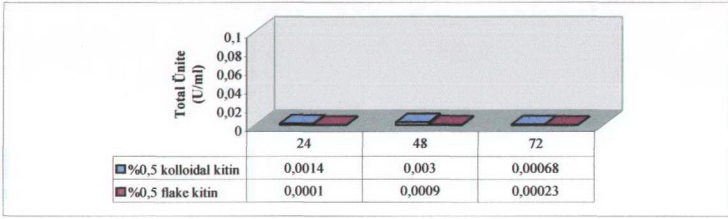


Şekil 6.6 Glukoz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında *A. niger*'in kitinaz indüksiyonu ve kitinaz aktivitesinin inkübasyon süresine (saat) göre değişimi

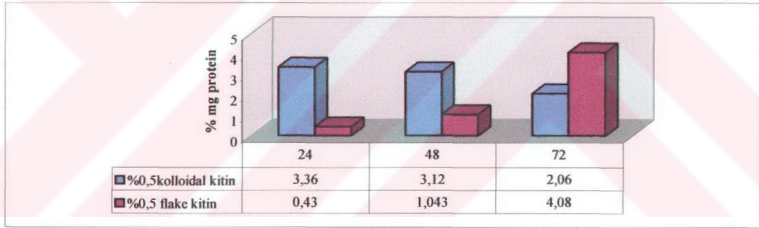


Şekil 6.7 Glukoz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında *A. niger*'in kitinaz indüksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi

Şekil 6.6 ve 6.7'de verilen değerler üç farklı çalışmanın ortalamasıdır.

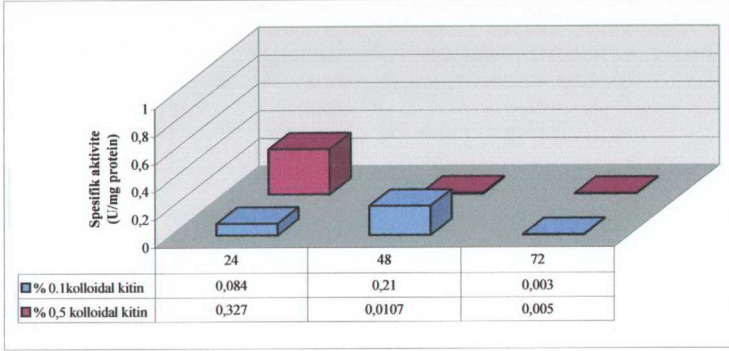


Şekil 6.8 Glukoz ile desteklenen ortamlarda *A.niger*'in kitinaz indüksiyonu ve kitinaz aktivitesinin inkübasyon süresine (saat) göre değişimi

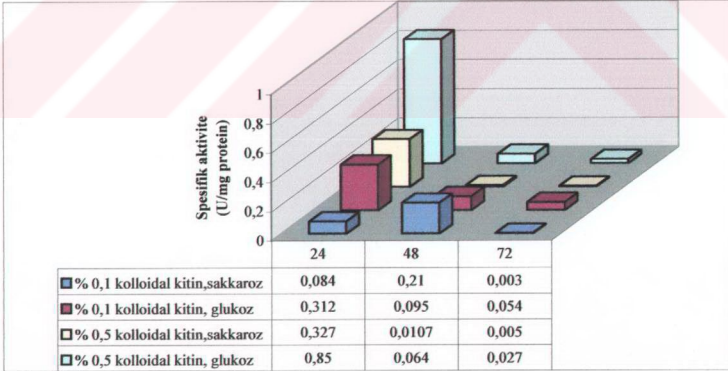


Şekil 6.9 Glukoz ile desteklenen ortamlarda *A.niger*'in kitinaz indüksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi.

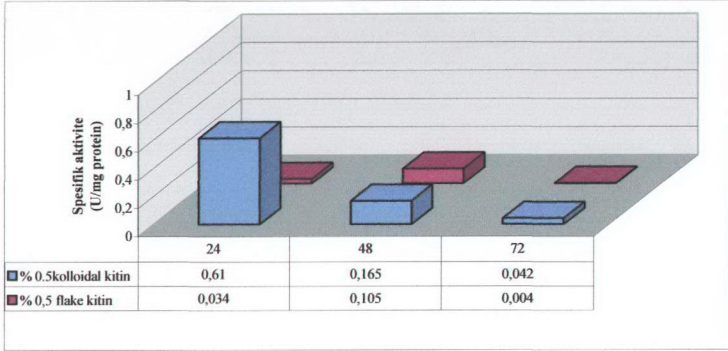
Şekil 6.8 ve 6.9'da verilen değerler üç farklı çalışmanın ortalamasıdır.



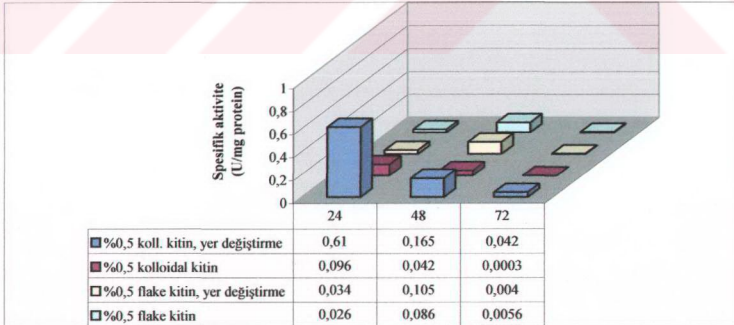
Şekil 6.10 *A. niger*'de koloidal kitin ile desteklenen ortamlarda inkübasyon süresinin kitinaz spesifik aktivitesine etkisi



Şekil 6.11 *A. niger*'de farklı karbon kaynaklarının inkübasyon süresine (saat) göre kitinaz spesifik aktivitesine etkisi.



Şekil 6.12 *A. niger*'de farklı kitin türlerinin inkübasyon süresine göre (saat) kitinaz spesifik aktivitesine etkisi



Şekil 6.13 *A. niger*'de yer değiştirme yönteminin inkübasyon süresine (saat) göre kitinaz spesifik aktivitesine etkisi

6.3 *T. atroviride*'de Kitinaz Aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşullar

6.3.1 Kitinaz Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması

T. atroviride'nin kitinaz üretimine, inkübasyon süresinin etkisini araştırmak için yapılan çalışmalarda ön kültivasyon sonrasında I. enzim üretim ortamına alınan miseller 24-96 saat arasında değişen sürelerde inkübe edildi. Her 24 saat sonunda alınan örneklerde total ünite (Şekil 6.14) ve protein (Şekil 6.15) ölçümleri yapılarak spesifik aktivite hesaplandı. Şekil 6.20'de görüldüğü gibi 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kitinaz spesifik aktivitesinin en yüksek olduğu görüldü.

6.3.2 Kullanılan Karbon Kaynağının Kitinaz Üretimine Etkisi

Sıvı besiyerinde ve enzim üretim ortamında karbon kaynağı olarak %1 sakkaroz veya %1 glukoz kullanılarak *T. atroviride*'nin kitinaz üretimi incelendi. Her 24 saatte alınan örneklerde total ünite, protein ve spesifik aktivite tayini yapıldı. %1 sakkaroz içeren ortamın total ünite ve protein grafikleri Şekil 6.14 ve 6.15'te verilmiştir. %1 glukoz içeren ortamın total ünite ve protein grafikleri ise Şekil 6.16 ve 6.17'de verilmiştir. Şekil 6.21'de görüldüğü gibi karbon kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı üretim ortamında kitinaz aktivitesinin en yüksek olduğu saptandı.

6.3.3 Kitin Konsantrasyonunun Kitinaz Üretimine Etkisi

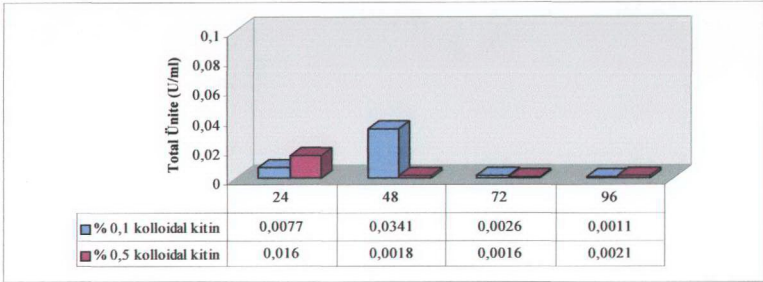
Şekil 5.1'de gösterildiği gibi hazırlanan kolloidal kitin %0,1 ve %0,5 konsantrasyonlarda *T. atroviride*'nin I. enzim üretim ortamına substrat kaynağı olarak ilave edildi. %0,1 kitin konsantrasyonu içeren ortamlarda kitinaz aktivitesinin en yüksek olduğu görüldü (Şekil 6.20).

6.3.4 Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Koşullarının Kitinaz Üretimine Etkisi

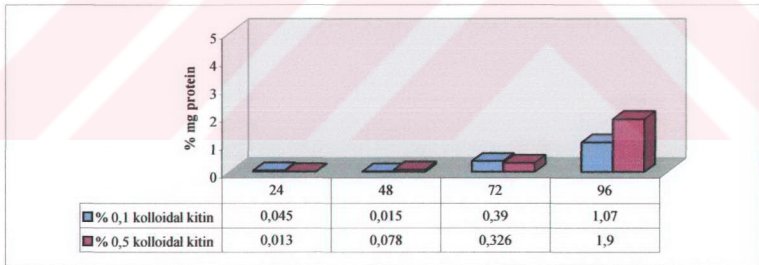
Ön kültive edilerek oluşturulan *T. atroviride* miselleri enzim üretim ortamına aktarıldıktan sonra bu besiyerlerinin üç tanesi çalkalamalı inkübasyon koşulunda diğer üç tanesi ise statik koşulda inkübe edildi. Statik koşulda inkübe edilen besi yerlerinde kitinaz aktivitesine rastlanmazken çalkalamalı koşulda inkübe edilen besiyerlerinde 48. saatte en yüksek aktiviteye rastlandı (Şekil 6.21).

6.3.5. Yer Değiştirme Yönteminin Kitinaz Üretimine Etkisi

%1 sakkaroz içeren ve %0,5 kolloidal kitin ile desteklenen sıvı besiyerine ekilen *T. atroviride* sporları yer değiştirme yapılmaksızın aynı ortamda inkübe edildi. 24 saat aralıklarla alınan örneklerde total ünite (Şekil 6.18) ve protein (Şekil 6.19) ölçümleri yapılarak spesifik aktivite hesaplandı. Paralel bir çalışmada ise %1 sakkaroz içeren sıvı besiyerinde üretilen *T. atroviride* miselleri 48 saat sonunda %0,5 kolloidal kitin içeren enzim üretim ortamına alınarak inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte alınan örneklerde total ünite (Şekil 6.14) ve protein (Şekil 6.15) ölçümleri yapılarak spesifik aktivite hesaplandı. Şekil 6.22’de görüldüğü gibi inkübasyondan 48 saat sonra yer değiştirme yapılan üretim ortamında en yüksek kitinaz spesifik aktivitesine rastlanmıştır.

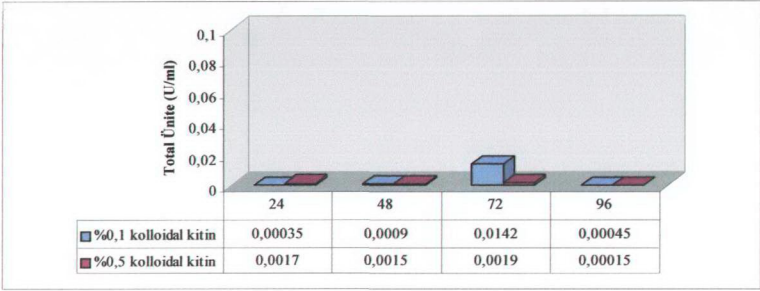


Şekil 6.14 Koloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında *T. atroviride*'nin kitinaz indüksiyonu ve kitinaz aktivitesinin zamana göre değişimi

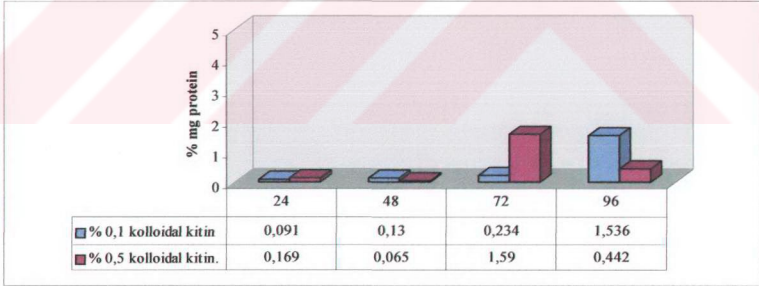


Şekil 6.15 Koloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında *T. atroviride*'nin kitinaz indüksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi

Şekil 6.14 ve 6.15'de verilen değerler üç farklı çalışmanın ortalamasıdır.

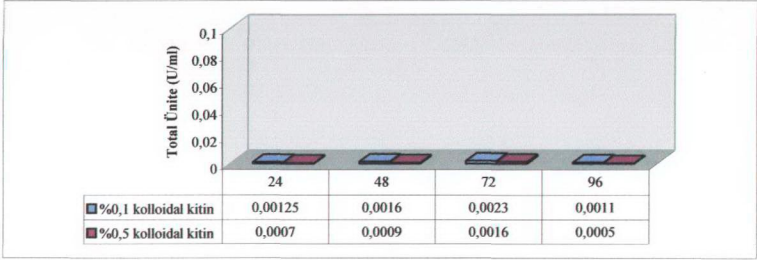


Şekil 6.16 Koloidal kitin içeren ve glukoz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında *T. atroviride*'nin kitinaz induksiyonu ve kitinaz aktivitesinin inkübasyon süresine (saat) göre değişimi

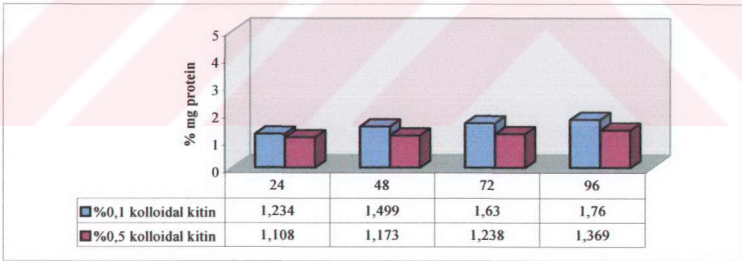


Şekil 6.17 Koloidal kitin içeren ve glukoz ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında *T. atroviride*'nin kitinaz induksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi

Şekil 6.16 ve 6.17'de verilen değerler üç farklı çalışmanın ortalamasıdır.

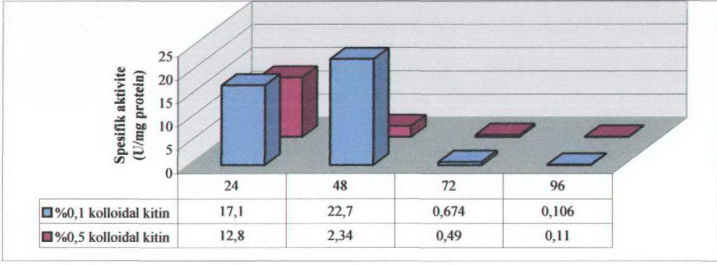


Şekil 6.18 Koloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenen ortamlarda *T. atroviride*'nin kitinaz induksiyonu ve kitinaz aktivitesinin inkübasyon süresine (saat) göre değişimi

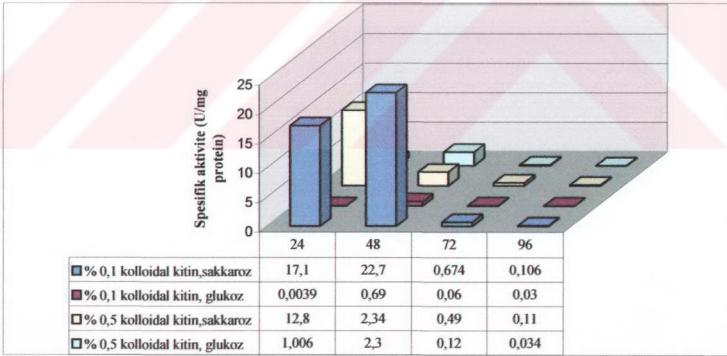


Şekil 6.19 Koloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenen ortamlarda *T. atroviride*'nin kitinaz induksiyonu ve protein miktarının inkübasyon süresine (saat) göre değişimi

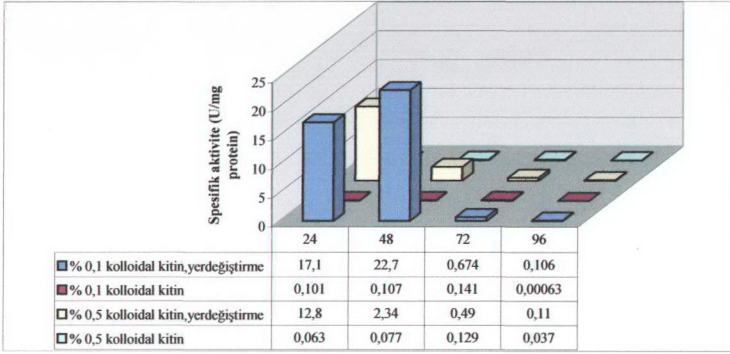
Şekil 6.18 ve 6.19'da verilen değerler üç farklı çalışmanın ortalamasıdır.



Şekil 6.20 *T. atroviride*'de kolloidal kitin ile desteklenen yer değiştirme ortamlarında inkübasyon süresinin (saat) kitinaz spesifik aktivitesine etkisi



Şekil 6.21 *T. atroviride*'de farklı karbon kaynaklarının inkübasyon süresine (saat) göre kitinaz spesifik aktivitesine etkisi

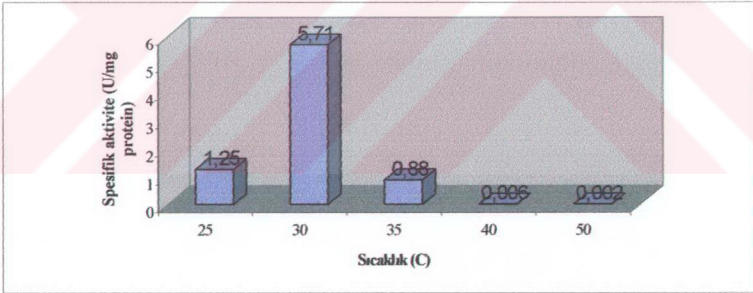


Şekil 6.22. *T. atroviride*'de yer değiştirme yönteminin inkübasyon süresine (saat) göre kitinaz spesifik aktivitesine etkisi

6.4 *T. atroviride*'den Kitinazın Karakterizasyonu

6.4.1 Sıcaklığın Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

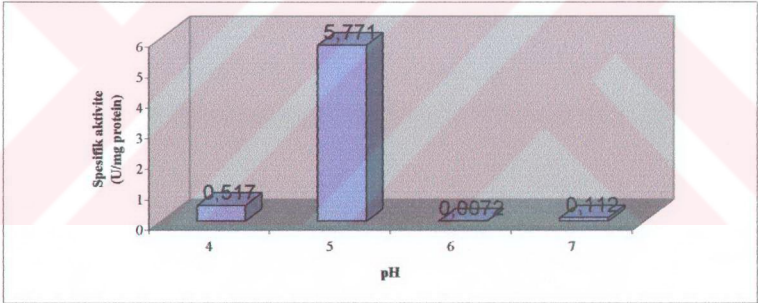
T. atroviride karbon kaynağı olarak %1 sakkaroz içeren steril ortama ekildi. 25°C-50°C arasında değişen sıcaklıklarda, çalkalamalı su banyosunda 48 saat kültüre edildi. Bu sürenin sonunda %0,1 kolloidal kitin içeren, sakkaroz ile desteklenen steril sıvı ortamlara alınan miseller 25°C-50°C arasındaki sıcaklıklarda 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun 48. saatinde alınan örneklerde indirgen şeker ve protein ölçümleri yapılarak spesifik aktivite hesaplandı. Bu verilere göre kitinaz spesifik aktivitesinin 30°C sıcaklıkta iken en yüksek değere ulaştığı gözlemlendi (Şekil 6.23).



Şekil 6.23 İnkübasyon sıcaklığının *T. atroviride* tarafından üretilen kitinaz aktivitesine etkisi

6.4.2 Ortamın pH'sının Kitinaz Üretimine Etkisinin Saptanması

%1 sakkaroz ile desteklenen steril enzim üretim ortamının başlangıç pH'ları 4-7 aralıklarında ayarlandı. Bu ortamlara *T. atroviride* sporları ekildi ve 30°C'de çalkalamalı su banyosunda 48 saat süresince üretildi. Bu sürenin sonunda aynı pH değerlerine sahip %0,1 kolloidal kitin içeren steril enzim üretim ortamlarına alınan miseller 30°C'de çalkalamalı su banyosunda 48 saat inkübe edildi. İndirgen şeker ve protein ölçümleri yapıldı ve kitinaz spesifik aktivitesi hesaplandı. Şekil 6.24'te görüldüğü gibi pH 5.0'a ayarlanan ortamlarda en yüksek kitinaz aktivitesine ulaşıldığı tespit edildi.



Şekil 6.24 Ortamın pH'sının *T. atroviride* tarafından üretilen kitinaz aktivitesine etkisi.

7. TARTIŞMA

Kitin doğada sellülozdan sonra en bol bulunan ikinci polimerdir. Deniz omurgasızları, böcekler, mantarlar ve algler doğal kitin kaynaklarıdır. Karides, yengeç, mürekkep balığı ve istiridyeye gibi su altı canlıları kitin içeriği bakımından zengin organizmalardır. Her yıl su altı organizmalarından 80,000 metrik ton kitin sağlanmaktadır (Muzzarelli, 1977; Subasinghe, 1995). Küf mantarlarının hücre duvarlarının %22-44'ü kitinden oluşmaktadır (Muzzarelli, 1977; Muzzarelli vd., 1994). Mantarsal atıklardan elde edilen kitin üretimi su altı atıklarından elde edilene göre önemsiz miktardadır. Kitin bitkiler, mantarlar ve bakteriler tarafından üretilen kitinolitik enzimler tarafından hidrolizlenebilir.

Yerleşik yaşamın başlayıp ilk insanların tarım hayatına geçişleri bakteriyel ve fungal patojenler ile kültür bitkileri arasında yakın bir ilişkinin başlangıcını oluşturmuştur. Bu yakın ilişki bazen hastalık salgınlarının ortaya çıkarak tüm ürünün kullanılmayacak duruma gelmesine ve bunun sonucunda da birçok insanın yaşamını yitirdiği kıtlıkların görülmesine neden olmuştur. Dünya nüfusunun hızla arttığı günümüzde, ürünlerin hastalıklardan korunması daha da önemli bir konu haline gelmiştir. Ürünleri hastalık ve zararlıların verebileceği zararlardan korumak için birçok yöntem kullanılmasına rağmen bakteri ve fungus kökenli hastalıklar halen kültür bitkilerini tehdit edici boyuttadır. Bakteriyel ve fungal hastalıkların yaptığı zararları önlemek için birçok durumda kimyasallar kullanılsa bile bitki hastalıklarının oluşturacağı zarar tamamen önlenemez. Üstelik kimyasalların kullanımı hem ürün maliyetini arttırması hem de çevreye ve öteki canlılara verebileceği olası zararlar yüzünden her geçen gün kısıtlanmaktadır (Özcan vd., 2001).

Çeşitli mantarlar ve bakteriler tarafından üretilen kitinazın bitki patojen mantarların ve zararlı böceklerin kontrolünde biyokontrol ajanı olarak rol oynadığı bir çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Örneğin *Aeromonas* (Chen vd., 1991), *Bacillus* (Watanabe vd., 1990), *Cellvibrio* (Wynne ve Pemberton, 1986), *Nocardia* (Nanjo vd., 1989), *Serratia* (Fuchs vd., 1986; Jones vd., 1986; Joshi vd., 1988) ve *Vibrio* (Soto-Gil ve Zyskind, 1984, Wortmann vd., 1986) gibi bakterilerin bazı türlerinin kitini etkin biçimde parçaladığı gösterilmiştir.

Birçok mantar türleri bitki patojenik mantarlara ve böceklerle karşı önemli biyokontrol ajanlarıdır. Mikoparazitik ve entomopatojenik mantarlar istila için ve konukçuyu öldüren bileşenlerden biri olarak kitinazları üretirler (Mathivanan vd., 1998; Kang vd., 1998; Higuchi vd., 1998).

Yer fıstığı pasının bir mikoparaziti olan *Fusarium chlamydosporum* suşu, *Puccinia arachidis* pas mantarının uredosporlarının filizlenmesini inhibe eden bir endo-kitinaz üretir. Bu olay yer fıstığı pasının biyokontrolünde kitinazın önemli bir katkısı olduğunu göstermektedir (Mathivanan vd., 1998). En fazla çalışılan mikoparazitik mantar olan *T. harzianum* kitinolitik enzimlerinin diğer kaynaklardan elde edilen enzimlerden daha geniş bir zararlı mantar aralığına inhibitör oldukları bulunmuştur (Lorito vd., 1993). *M. verrucaria* kitinaz, β -1,3 glukanaaz ve proteinaz gibi yüksek düzeyde ekstrasellüler mikolitik enzimleri üretir (Vyas ve Deshpande, 1989; Deshpande, 1998).

Böcekler ve patojenik küf mantarları dış kabuklarında kitin içerdikleri için bitkilerde kitinazların indüksiyonu başlıca savunma yanıtıdır. Hadwiger ve Beckman, bezelye iç dokusunun (endokarp) ekstraktlarının kitinaz ve kitobiyaz aktivitesi içerdiğini göstermişlerdir (Hadwiger ve Beckman, 1980). Kitinaz aktivitesi ile savaşılan fasulye pas mantarının (*Uromyces viciice-fabae*) hücre duvarındaki kitosan formasyonu kendini savunmada bitki kitinazlarının yardımını gösteren en iyi bir kanıttır (Deising ve Siegrist, 1995). *Trichoderma harzianum*'dan elde edilen kitinazın toprak kökenli mantarların ve patojenlerin geniş bir aralığına karşı aktif olduğu gözlenmiştir (Irene vd., 1994).

Çeşitli küf mantarlarını kitinaz üretimleri yönünden incelemek ve bu küf mantarlarının optimum enzim üretim koşullarını belirlemek çalışmanın temel amacıdır.

Trichoderma ve *Aspergillus* türleri endüstride enzim (amilaz, sellüloz, pektinaz, mannanaz, β -galaktozidaz...) ve organik asitlerin (sitrik asit, okzalik asit...) üretimi için çok yaygın olarak kullanılan küf mantarlarıdır. Bu bilgilerin ışığında çalışmamızda kullanacağımız küf mantarlarından kitinazın da indüklenebileceği düşünüldü.

İlk aşamada *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1), *Trichoderma koningi*, *Trichoderma reesei* ve *Aspergillus niger* isimli küf mantarları spesifik aktiviteleri yönünden karşılaştırıldı (Şekil 6.1). Grafikte de görüldüğü gibi *T. atroviride*'de en yüksek kitinaz aktivitesi gözlenirken *A. niger*'de çok düşük seviyede kalmıştır. Endüstride çok kullanılan bir küf mantarı olan *A. niger*'de kitinaz indüksiyonunu arttırmak için koşullar değiştirilerek optimum şartların sağlanmasına çalışılmıştır.

A. niger ile yapılan çalışmalarda ilk önce en yüksek kitinaz spesifik aktivitesinin gözlemlendiği inkübasyon süresi saptandı. İnkübasyonun 24. saatinde maksimum aktivite görüldü (Şekil 6.10).

Substrat konsantrasyonu açısından incelendiğinde *A. niger* %0,5 koloidal kitin ile desteklenen enzim üretim ortamında en yüksek aktiviteye ulaştı (Şekil 6.10).

Farklı karbon kaynakları yönünden incelendiğinde %1 glukoz içeren ortamlarda spesifik aktivitenin %1 sakkaroz içeren ortamlara kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 6.11).

Koloidal kitin içeren ve glukoz ile desteklenen ortamlarda koloidal kitin konsantrasyonu %0,5'e çıkarıldığında maksimum aktiviteye ulaştığı gözlemlendi (Şekil 6.11).

İndüksiyonu arttırmak için kullanılan diğer ortamda %0,5 konsantrasyonlarda farklı kitin kaynakları kullanıldı. Önceki çalışmamızda %0,5 koloidal kitin ile daha yüksek aktivite sağlandığı için bu konsantrasyon ile çalışıldı (Şekil 6.10). Şekil 6.12'de görüldüğü gibi koloidal kitin ile yapılan çalışmada daha yüksek aktivite saptadı.

Bütün bunların yanısıra yer değiştirme yönteminin aktiviteye etkisi incelendi ve Şekil 6.13'te görüldüğü gibi yerdeğiştirme yapılan ve %0,5 koloidal kitinli ortamda aktivitenin arttığı tespit edildi.

A. niger ile yapılan çalışmaların sonucunda; glukoz ile desteklenen, %0,5 koloidal kitin içeren, çalkalayıcıda inkübe edilen ve yerdeğiştirme yapılan ortamda kitinaz aktivitesinin saflaştırma için yeterli olmadığı görüldü.

İlerideki çalışmalarımızda kitinazı saflaştırmayı amaçladığımız için *A. niger*'de gözlenen spesifik aktivite yeterli bulunmadı. Bu yüzden kitinazın izolasyonuna imkan vereceği düşünülerek en yüksek aktivite gösteren küf mantarı olan *T.atroviride* ile çalışıldı.

T.atroviride ile yapılan çalışmaların sonucunda ise %0,1 koloidal kitin içeren, sakkaroz ile desteklenen, yer değiştirme yapılan ve çalkalayıcı ortamda 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda maksimum kitinaz aktivitesi tespit edildi (Şekil 6.21 ve 6.22).

Yapılan çalışmaların sonucunda *Aspergillus niger* tarafından üretilen kitinazın enzim izolasyonu için yeterli olmadığı görüldü. Elde edilen bulgulara dayanarak bir mutant olan *Trichoderma atroviride* tarafından salgılanan kitinaz miktarının karakterizasyon ve izolasyon çalışmaları için yeterli miktarda olduğu sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- Aloise, P.A., Lumme, M. ve Haynes, C.A., (1996), N-acetylglucosamine production from chitin-waste using chitinases from *Serratia marcescens*. In: Muzzarelli, R.A.A., editor. Chitin Enzymology, Vol. 2. Grotammare: Eur. Chitin Soc., p.581-589.
- Barthorneuf, C., Regerat, F. ve Pourrat, H., (1994), "Improvement in tannase recovery using enzymatic disruption of mycelium in combination with reverse micellar enzyme extraction", Biotechnol. Tech., 8:137-142.
- Barnicki-Garcia, S., (1968), "Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy", Annu. Rev. Microbiol., 22:87-109.
- Benhamou, N. ve Asslin, A., (1989), "Attempt localization of a substrate for chitinase plant cell reveals abundant N-acetyl-D-glucosamine residues in secondary walls", Biol. Cell., 67:341-350.
- Benitez, T., Limon, C., Delgado-Jarana, J. ve Rey, M., (1998), Glucanolytic and other enzymes and their genes, p. 101-127. In Harman, G.E. and Kubicek, C.(ed.), *Trichoderma* and *Gliocladium*: enzymes, biological control and commercial applications, Vol. 2. Taylor and Fravcis, Ltd., London, United Kingdom.
- Berkely, R.C.W., (1979), Chitin, chitosan and their degradative enzymes. In: Berkely, R.C.W., Gooday, G.W., Ellwood, D.C., editors. Microbial polysaccharides. London: Academic Press. p.205-306.
- Bielka, H., Dixon, H.B.F., Karlson, P., Liebecg, C., Sharon, N., Van Lenten, S.F., Velick, S.G., Vliengenthant, J.F.G. ve Webt, E.C., (1984) Enzyme Nomenclature, Academic Press, Inc. New York.
- Blaak, H., Schnellmann, J., Walter, S., Henrissat, B. ve Schrepf, H., (1993), "Characteristics of an exochitinase from *Streptomyces olivaceoviridis*, its corresponding gene, putative protein domains and relationship to other chitinases", Eur. J. Biochem., 214:659-669.
- Blackwell, J., Gardner, K.H., Kolpapk, F.J., Minke, R. ve Classey, W.B., (1980), A.C.S. Symp. Ser., 141:315.
- Bradford, M.M., (1979), "A rapid and sensitive method for quantification of micrograms of protein utilising the principle of protein-dye-binding", Anal. Biochem., 72:248-254.
- Cabib, E., (1987), "The synthesis and degradation of chitin." Adv. Enzymol. 59: 59-101
- Chen, J.P., Nagayama, F. ve Chang, M.C., (1991), "Cloning and expression of a chitinase gene from *Aeromonas hydrophila* in *Escherichia coli*", Appl. Environ. Microbiol., 57:2426-2428.
- Chen, J.P. ve Chang, K.C., (1994), "Immobilization of chitinase on a reversibly soluble-insoluble polymer for chitin hydrolysis.", J. Chem. Technol. Biotechnol., 60:133-140.
- Chet, I., Harman, G.E. ve Baker, R., (1981), "*Trichoderma hamatum*; its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Phyitium* spp.", Microbiol. Ecol., 7:29-38.
- Chet, I. ve Elad, Y., (1983), In Mechanism of Mycoparasitism (Colloq. Inst. Natl. Rech. Agron., Paris), Vol.18., 35-40.

Chet, I., Benhamou, N. ve Haran, S., (1998), Mycoparasitism and lytic enzymes, p. 153-172. In G.E. Harman and C. Kubicek (ed.), *Trichoderma and Gliocaldium: enzymes, biological control and commercial applications*, vol.2. Taylor and Francis, Ltd., London, United Kingdom.

Christine, G., Kenneth, E. ve James E., (1983), "Fluid drilling: a potential delivery system for fungal biological control agents with small-seeded vegetables", *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 63:100.

Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U. ve Vad, K., (1993), "Plant Chitinases", *Plant J.*, 3:31-49.

de la Cruz, J.A. ve Liobell, A., (1999), "Purification and properties of a basic endo- β -1,6-glucanase (BGN 16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*", *Eur. J. Biochem.*, 265:145-151.

de la Cruz, J.A., Rey, M., Lora, J.M., Hidalgo-Gallego, A., Dominguez, F., Pintor-Toro, J.A., Benitez, A. ve Liobell, A., (1995), "Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* related to its mycoparasitism", *Arch. Microbiol.*, 159:316-322.

de Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., ve Figueras, M.J., (2000), *Atlas of Clinical Fungi*, 2 nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Deising, H. ve Siegrist, J., (1995), "Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-fabae* is controlled by fungal morphogenesis", *FEMS Microbiol. Lett.*, 127:207-212.

Deshpande, M.V., (1986), "Enzymatic degradation of chitin and its biological applications", *J. Sci. Ind. Res.*, 45: 277-281.

Deshpande, M.V., (1998), "Cuticle degrading and mycolytic enzymes with special reference to chitinases as biopesticides: status, potential and challenges. In: *Proceeding of biotechnology- a challenge for 2005*. New Delhi: All India Biotech Association, p.1-4.

Domsch, K.H., Gams, W. ve Anderson, T.H., (1980), *Compendium of soil fungi*, vol.1, Academic Press.

Elad, Y., Chet, I. ve Henis, Y., (1982), "Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*", *Can. J. Microbiol.* 28:719-725.

Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. ve Henis, Y., (1983a), "Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-scanning electron microscopy", *Phytopathol.*, 73:85-88.

Elad, Y., Barak, R., Chet, I. ve Henis, Y., (1983b), "Ultrastructural studies of the interaction between *Trichoderma* spp. and plant pathogenic fungi", *Phytopathol. Z.*, 107:168-175.

Enzyme Nomenclature (International Union Biochemistry), (1961), Elsevier, Amsterdam.

Ferron, P., (1985), Fungal control, In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.J., editors. *Comprehensive insect biochemistry and pharmacology*, Vol.12, Oxford: Pergamon Press, p.313-346.

Flach, J., Pilet, P.E. ve Jolles, P., (1992), "What's new in chitinase research?", *Experientia*, 48:701-716.

Friedman, S.J. ve Skehan, P., (1980), "Membrane-active drugs potentiate the killing of tumor cells by D-glucosamine", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1172-1176.

- Fuchs, R.L., Mc Person, S.A. ve Drahos, D.J., (1986), "Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase", Appl. Environ. Microbiol., 51:504-509.
- Fukamizo, T., (2002), "Chitinolytic Enzymes: Catalysis, substrate binding, and their application", Laboratory of Biophysical Chemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University, Japan.
- Gardner, K.H. ve Blackwell, J., (1974), "The structure native cellulose", Biopolymers, 13:1975-2001.
- Gokhale, D.V., (1992), "Fungal protoplast fusion-a tool for breeding industrial strains", J. Sci. Ind. Res., 51:497-506.
- Gooday, G.W., (1990), "Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan", Biodegradation, 1: 177-190.
- Gooday, G.W., (1994), Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan, In C. Ratledge (ed.), p. 279-312, Biochemistry and microbial degradation, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Gooday, G.W., (1995), Diversity of roles for chitinases in nature. In: Zakaria M.B., Wan Muda W.M., Abdullah M.P., editors. Chitin and Chitosan. Malaysia: Penerbi University Kebangsaan, p. 191-202.
- Gooday, G.W., (1997), "The ever-widening diversity of chitinase", Carbohydrates Europe, 19:18-22.
- Gross, P., Konrad, E. ve Mager, H., (1983), Parfeum Kosmet, 64:367.
- Hadar, Y., Chet, I. ve Henis, Y., (1979), "Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*", Phytopathology, 69:64.
- Hadwiger, L.A. ve Beckman, J.M., (1980), "Chitosan as a component of a *Fusarium solani* interactions", Plant Physiol., 66:205-211.
- Harman, G.E., Chet, I. ve Baker, R., (1980), "*Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*", Phytopathol., 70:1167-1172.
- Henrissat, B., (1991), "A classification glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities", Biochem. J., 280: 309-316.
- Henrissat, B. ve Bairoch, A., (1993), "New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities", Biochem. J., 293:781-788.
- Higuchi, T., Okubo, K., Saiga, T. ve Senda, S., (1998), Enzymic treatment in control of insect pests with entomopathogenic fungi. Jpn Kokai Tokyo Koho J.P. 10067613 A2 10 Mar 1998, Heisei. (C.A. 128:Patent 254077).
- Hjeljord, L. ve Tronsmo, A., (1998), *Trichoderma* and *Gliocaldium* in biological control: an overview, p. 131-151. In G.E. Harman and C. Kubicek (ed.), *Trichoderma* and *Gliocaldium*: enzymes, biological control and commercial applications, vol.2. Taylor and Francis, Ltd., London, United Kingdom.
- Horn, J.S. ve Eijssink, V.G.H., (2004), "A reliable reducing end assay for chito-oligosaccharides", Carb. Polym., 56:35-39.

- Ilyina, A.V., Tikhonov, V.E., Varlamov, V.P., Radigina, L.A., Tatarinova, N.Y. ve Yamskov, H.A., (1995), "Preparation of affinity sorbents and isolation of individual chitinases from a crude supernatant produced by *Streptomyces kurssanovii* by a one-step affinity-chromatographic system", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 21:139-148.
- Irene, G., Jose, M.L., de la Cruz, J., Tahia, B., Antonio, L., Jose, A. ve Pintor, T., (1994), "Cloning characterization of chitinase (CHIT 42) cDNA from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*", *Curr. Genet.*, 27:83-89.
- Iseli, B., Boller, T. ve Neuhaus, J.-M., (1996), Functional analysis of the domains of a plant PR-3 chitinase. In: Muzzarelli, R.A.A. editor. *Chitin Enzymology*, Vol.2, Atec Edizioni-Grottammare, p.136-142.
- Jeuniaux, C., (1961), "Chitinase: an addition to the list of hydrolases in the digestive tract of vertebrates", *Nature*, 192:135-136.
- Jones, J.D.G., Grady, K.L., Suslow, T.V., ve Bedbrook, J.R., (1986), "Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*", *EMBO J.*, 5:467-473.
- Joshi, S., Kozlowski, M., Selveraj, G., Iyer, V.N. ve Davies, R.V., (1988), "Cloning of the chitin utilization regulation of *Serratia liquefaciens*", *J. Bacteriol.*, 170:2984-2988.
- Kang, S.C., Park, S. ve Lee D.G., (1998), "Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisoplia*", *FEMS Microbiol. Lett.*, 165:267-271.
- Kelkar, H.S., Shankar, V. ve Deshpande, M.V., (1990), "Rapid isolation and regeneration of *Sclerotium rolfsii* protoplast and their potential application for starch hydrolysis", *Enzyme Microb. Technol.*, 12:510-514.
- Keyhani, N.O. ve Roseman, S., (1997), "Wild-type *Escherichia coli* grows on the chitin dissaccharide, *N,N'*-diacetylchitobiose, by expressing the cell operon", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:14367-14371.
- Keyhani, N.O., Wang, X., Lee, Y.C. ve Roseman, S., (2000), "The chitin dissaccharide, *N,N'*-diacetylchitobiose, is catabolized by *Escherichia coli* and is transported/phosphorylated by the phosphoenolpyruvate: glycosyl transferase system", *J. Biol. Chem.*, 275:33084-33090.
- Kobayashi, S., Kiyosada, T. ve Shoda, S., (1997), "A novel method for synthesis of chitobiose via enzymatic glycosylation using a sugar oxazoline as glycosyl donor", *Tetrahedron Lett.*, 38:2111-2112.
- Kombrink, E. ve Somssich I.E., (1995), "Defense responses of plants to pathogens", *Adv. Bot. Res.*, 21:2-34.
- Kramer, K.J. ve Muthukrishnan, A., (1997), "Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides", *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27:887-900.
- Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K. ve Lorito, M., (2001), "*Trichoderma*: from genes to biocontrol", *J. Plant Pathol.*, 83(2), 11-23.
- Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S. ve Shimoda, K., (1993), *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 31: 485.

Kurita, K., (1997), In: Goosen MFA., editor. Applications of chitin and chitosan, Lancaster, PA: Technomic Publishing, p.79.

Kurita, K., (1997), In: Muzzarelli, R.A.A., Peter, M.G., editors, Chitin handbook, Grottammare: Atec edizioni, p.491.

Lagorce, A., Le Berre-Anton, Aguilar-Uscanga, B., Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A. ve François, J., (2002), "Involvement of GFA1, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*", *Eur. J. Biochem.*, 269:1697-1707.

Lee, S.Y., Jung, S.W., Kim, S.H. ve Lee, Y.N., (1993), Intergeneric protoplast fusion between *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus oryzae*", *Misaengmul Hakhoechi*, 31:218-223.

Limon, M.C., Margolles-Clark, E., Benitez, T. ve Penttilä, M., (2001), "Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*", *FEMS Microbiol. Lett.*, 198:57-63.

Lorito, M., (1998), Chitinolytic enzymes and their genes, p. 153-172., In Harman, G.E. and Kubicek, C., (ed.), *Trichoderma* and *Gliocladium*: enzymes, biological control and commercial applications, Vol. 2. Taylor and Francis, Ltd., London, United Kingdom.

Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.I. ve Di Pietro, A., (1993), "Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase", *Phytopathology*, 83:303-307.

Mathivanan, N., Kabilan, V. ve Murugesan, K., (1998), "Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*", *Can. J. Microbiol.*, 44:646-651.

Mathur, N.K. ve Narang, C.K., (1990), "Chitin and chitosan, *Versatile polysaccharides* from marine animals", *J. Chemical Education*, 67:11:938-942.

Mazeau, K., Winter, W.T. ve Chanzy, H., (1994), "The molecular and crystal structure of a high temperature polymorph of chitosan from electron diffraction data", *Macromolecules*, 27:7606.

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", *Biotechnol. Lett.*, 18:373-376.

Merz, R.A., Horsch, M., Nyhlen, L.E. ve Rast, D.M., (1999), "Biochemistry of chitin synthase", *EXS.*, 87:9-37.

Miller, G.L., (1958) "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Anal. Chem.* 31:426-428.

Miller, M., Palojarvi, A., Rannger, A., Reeslev, M. ve Kjoller, A., (1998), "The use of fluorogenic substrates to measure fungal presence and activity in soil", *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:613-617.

Minke, M., Blackwell, J., (1978), "The structure of α -chitin", *J. Mol. Biol.*, 120:167.

Murao, S., Kawada, T., Itoh, H., Oyama, H. ve Shin, T., (1992), "Purification characterization of a novel type of chitinase from *Vibrio alginolyticus*", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56:368-369.

- Muzzarelli, R.A.A., (1977), Chitin, Pergamon Press, Oxford.
- Muzzarelli, R.A.A., Ilari, P.A., Tarsi, R., Dubini, B. ve Xia, W., (1994), "Chitosan from *Absidia coerulea*", Carbohydr. Polym., 25:45-50.
- Muzzarelli, R.A.A. ve Muzzarelli, C., (1998), Native and modified chitins in the biosphere, ACS Symposium Series 707:148-162.
- Muzzarelli, R., (1999), Native, industrial, and fossil chitins, In R. A. Muzzarelli and P. Jooaes (ed.), Chitin and chitinases, p. 1-5, Birkhauser, Basel, Switzerland.
- Nampoothri, M.K., Baiju, T.V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G. ve Pandey, A., (2003), "Process optimizatin for anti fungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*", Process Biochemistry, (In press).
- Nagona, H., Orengo, C.A. ve Thornton, J.M., (2002), "One fold with many functions; the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions", J. Mol. Biol. 321: 741-765.
- Nanjo, F., Sakai, K., Ishikawa, M., Isobe, K. ve Usui, T., (1989), Properties and transglycosylation reaction of a chitinase from *Nocardia orientalis*", Agric. Biol. Chem., 53:2189-2195.
- Nanjo, F., Ishikawa, M., Katsumi, R. ve Sakai, K., (1990), "Purification, properties, and transglycosylation reaction of β -N-acetylhexosaminidase from *Nocardia orientalis*", Agric. Biol. Chem., 24:47-54.
- Nogawa, M., Takahashi, H., Kashiwagi, A., Ohshima, K., Okada, H. ve Morikawa, Y., (1998), "Purification and characterization of exo- β -D-Glucosaminidase from a cellulolytic fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7." Applied and Environmental Microbiology 64 (3) : 890 – 895.
- Ordentlich, A., Elad, Y. ve Chet, I., (1988), "The role of chitinase of *Serratia marcescens* biocontrol of *Sclerotium rolfsii*", Phytopathol., 78:84-88.
- Özcan, S., Gürel, E. ve Babaoğlu, M., (2001), Bitki Teknolojisi, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Park, J.K., Keyhani, N.O. ve Roseman, S., (2000), "Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Identification, molecular cloning and characterization of a *N,N'*-diacetylchitobiose phosphorylase", J. Biol. Chem., 275:33077-33083.
- Patil, R.S., Gormade, V. ve Deshpand, M.V., (2000), "Chitinolytic enzymes: an exploration." Enzyme Microb. Technol. 26: 473 – 483.
- Peberdy, J.F., (1989), "Fungi without coats-protoplast as tools for mycological research", Mycol. Res., 93:1-20.
- Perakis, A., Wilson, K.S. ve Chet, I., (1993), Oppenheim A.B., Vorgias C.E., Phylogegtic relationships of chitinases. In: Muzarelli R.A.A., editor. Chitin Enzymology. Ancona:Eur. Chitin Soc, p.217-232.
- Revah, M.S. ve Corroad, A., (1981), "Conversion of the enzymatic hydrolysate of shelfish waste chitin to single – cell protein." Biotechnol. Bioeng. 23: 1067-1078.
- Roberts, G.A.F., (1992), Chitin in chemistry, London, Macmillan.

- Roberts, W.A. ve Selitrennikoff, C.P., (1988), "Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity", *J. Gen Microbiol*, 134:169-176.
- Roco, A. ve Perez, L.M., (2001), "In vitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Aternaria alternata* in the presence of growth regulators." *Electron. J. Biotechnol.*, 4(2):120-125.
- Rudall, K.M. ve Kenchington, W., (1973), "The chitin system", *Biol. Rev.*, 48,597-636
- Roehr, M., Kubicek, C.P. ve Kominek, J., (1996), Citric acid, in *Biotechnology*, 2. edition, Eds. Rehm, H.J., Reed, G., Pühler, A., and Stadler, P., Vol. 6, Ed., Roehr, M., Verlagg Chemie, Weinheim, p. 307-345.
- Roy, I., Sardar, M. ve Gupta, M.N., (2003), "Hydrolysis of chitin by Pectinex", *Enzyme Microb. Technol.*, 32:582-588.
- Rudrapatnam, N., Tharanathan, R.N. ve Kittur, F.S., (2003), "Chitin the undisputed biomolecule of great potential" *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (1) : 61-87.
- Rutherford, F.A. ve Austin, P.R., (1978), In: Muzzarelli, R.A.A., Pariser, E.R., editors, *Proceedings of the first international conference on chitin / chitosan*, MIT, Sea Grant Report, MITSG, 78:7, p.182.
- Sahai, A.S. ve Monacho, M.S., (1993), "Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction", *FEMS Microbiol. Rev.*, 11:317-338.
- Saito, Y., Putaux, J.L., Okano, T., Gaill, F. ve Chanzy, H., (1997), "Structural aspects of the swelling of beta chitin in HCl and its conversion into alpha chitin", *Macromolecules*, 30: 3867-3873.
- Sakuda, S., (1996), Studies on the chitinase inhibitors, allosamidins. In: Muzzarelli, R.A.A., editor. *Chitin Enzymology*, Vol.2. Grottammare: Eur. Chitin Soc., p.203-212.
- Shaikh, S.A. ve Deshpande, M.V., (1993), "Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9:468-475.
- Shapira, R., Ordentlich, A. ve Chet, I., (1989), "Oppenheim A.B. Control of plant disease by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*", *Phytopathol.*, 79:1246-1249.
- Simirnoff, W.A., (1977), In: Muzzarelli, R.A.A., editor, *Chitin*, Oxford: Pergamon Press, p.57.
- Soto-Gil, R.W. ve Zyskind, J.W., (1984), "Cloning of *Vibrio harveyi* chitinase and chitobiase in *Escherichia coli*, in *Chitin, chitosan and related enzymes* (Zikakis, J.P., ed.) Academic Press, London, p.209-223.
- St-Germain, G. ve Summerbell, R., (1996), *Identifying Filamentous Fungi-A Clinical Laboratory Handbook*, 1 st ed. Star Publishing Company, Belmont, California.
- Stoyachenko, I.A., Varlamov, V.P. ve Davankov, V.A., (1994), "Chitinases of *Streptomyces kurssanovii*: purification and some properties", *Carbohydr. Polym.*, 24:47-54.
- Subasinghe, S., (1995), The development of crustacean and mollusc industries for chitin and chitosan resources. In: Zakarai, M.B., Wan Muda, W.M., Abdullah, M.P., editors. *Chitin and Chitosan*. Malaysia: Penerbit Universiti Kebangsaan, p.27-34.

Suzuki, K., Sugawara, N., Uchiyoma, T., Katouno, F., Nikaidou, N. ve Watanabe, T., (2002), "Chitinases A, B, C 1, of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation", Biosci., Biotechnol. and Biochem., 66(5):1075-1083.

Tanaka, T., Fukui, T., Atomi, H. ve Imanaka, T., (2003), "Characterization of an exo- β -D-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic *Archaeon thermococcus kodakaraensis* KOD 1", J. Bacteriol., 185(17) : 5175-5181.

Terayama, H., Takahashi, S. ve Kuzuhara, H., (1993), "Large-scale preparation of N,N'-diacetylchitobiose by enzymic degradation of chitin and its chemical modifications", J. Carbohyd. Chem., 12:81-93.

Tom, R.A. ve Carroad, P.A., (1981), "Effect of reaction conditions on hydrolysis of chitin by *Serratia marcescens* QMB 1466 chitinase", J. Food Sci., 46:646-647.

Ulhoa, C.J. ve Peberdy, J.F., (1991), "Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*", J. Gen. Microbiol., 137:2163-2169.

Usui, T., Matsui, H. ve Isobe, K., (1990), "Enzymic synthesis of chitooligosaccharides utilizing transglycosylation by chitinolytic enzymes in a buffer containing ammonium sulfate", Carbohyd. Res. 203:65-77.

Villagomez-Castro, J.P., Pedraza-Reyes, M., Calvo-Mendez, C. ve Lopez-Romero, E., (1993), Fungal and amebic chitinases. In: Muzzarelli, R.A.A., editor. Chitin Enzymolgy. Ancona: Eur. Chitin Soc. p.311-322.

Vyas, P.R., (1991), Studies of chitinolytic enzymes. Pune: submitted to University of Pune, Ph. D. Thesis.

Vyas, P.R. ve Deshpande, M.V., (1989), "Chitinase production by *Myrothecium veerucaria* and its significance for fungal mycelial degradation", J. Appl. Gen Microbiol., 83: 302-307.

Wagner, G.P., (1994), "Evolution and multi-functionality of the chitin system", EXS. 69:559-577.

Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K. ve Tanaka, H., (1990), "Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation", J. Bacteriol., 172:4017-4022.

Watanabe, T., Kobori, K., Yamada, T., Ito, Y., Uchida, M. ve Tanaka, H., (1993), Domain structures and functions of bacterial chitinases. In: Muzzarelli, R.A.A., editor. Chitin Enzymology. Ancona: Eur. Chitin Soc., p.329-336.

Weindling, R., (1932), "*Trichoderma lignorum* as a parasitic of other soil fungi", Phytopathol., 22:837-845.

Wortmann, A.T., Sommerville, C.C. ve Colwell, R.R., (1986), "Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus*: gene cloning and applications of a chitinase probe", Appl. Environ. Microbiol., 52:1362-1367.

Wu, M.L., Chuang, Y.C., Chen, C.S. ve Chang, M.C., (2001), "Identification and characterization of the three chitin-binding domains within the multidomain chitinase Chi92 from *Aeromonas hydrophila* JP101", Appl. Environ. Microbiol., 67(11): 5100-5106.

Wynee, E.C., ve Pemberton, J.M., (1986), "Cloning of a gene cluster from *Cellvibrio mixtus* which codes for cellulase, chitinase, amylase and pectinase", Appl. Environ. Microbiol., 52:1362-1367.

Xia, G., Jin, C., Zhou, J., Yang, S., Zhang, S., ve Jin, C., (2001), "A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407", Eur. J. Biochem., 268:4079-4085.

Zakaria, Z., (1997), Lactic acid purification of chitin from prawn waste using a horizontal rotating bioreactor, Ph. D. Thesis, Loughborough University .

Zikakis J.P., (1989), Chitinolytic enzymes and their applications. In: Whitaker J.R., Sonnet P.E., editors. Biocatalysts in Agricultural Biotechnology, ACS Symposium Series 389. Washington, DC: American Chemical Society, p. 116-126.

Zobell, C. ve Rittenberg, S., (1937), "The occurrence and characteristics of chitinoclastic bacteria in the sea", J. Bacteriol. 35:275-287.

INTERNET KAYNAKLARI

[1] <http://www.geocities.com>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 04.03.1977

Doğum yeri Niğde

Lise 1991 - 1994 Çemberlitaş Kız Lisesi

Lisans 1995 - 1999 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak.
Kimya Bölümü

Yüksek Lisans 2001-2005 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı

Çalıştığı kurum(lar)

2002-2003 Kansuk Laboratuvarı A.Ş.

2003 - ... YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi