



**LOR PEYNİRİNDEN ELDE EDİLEN *Lactobacillus*
coryniformis'İN KİTİNAZAKTİVİTESİNİN
BELİRLENMESİ VE *Alternaria alternata*
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Selda Nur HACIABDULLAHOĞLU

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ**

2018

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LOR PEYNİRİNDEN ELDE EDİLEN *Lactobacillus coryniformis*'İN
KİTİNAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ VE *Alternaria
alternata* ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Selda Nur HACIABDULLAHOĞLU

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2018

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

**LOR PEYNİRİNDE ELDE EDİLEN *Lactobacillus coryniformis*'İN KİTİNAZ
AKTİVİTESİNİN BELİRELENMESİ VE *Alternaria alternata* ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Prof.Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında, Selda Nur HACIABDULLAHOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma, 06/04/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ

İmza : 

Üye : Prof.Dr. Neslihan DİKBAŞ

İmza : 

Üye : Dr.Öğrt. İsmail BEZİRGANOĞLU

İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **10.05/2018** tarih ve **...19.../...13.....** nolu kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LOR PEYNİRİNDEN ELDE EDİLEN *Lactobacillus coryniformis*'İN KİTİNAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ VE *Alternaria alternata* ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Selda Nur HACIABDULLAHOĞLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Bakterilerin biyoteknolojide kullanım alanları son yıllarda giderek artmaktadır. Bitkilerden, hayvanlardan farklı olarak bakteriler hızlı çoğalan biyokimyasal etkileri bakımından canlılar aleminin ve ekosisteminin dengesini sağlayan en önemli organizmalardır. Bakterilerin günümüzdeki insan yaşamını etkileyen çok önemli bir özelliği biyoteknolojideki yaptığı katkılardır. Biyoteknolojik olarak bakteriler üzerinde çeşitli çalışmalar yapılarak fayda ve ürün eldesi mümkündür. Bu nedenle bakterilerden elde edilen ve endüstriyel boyutu çok yüksek olan enzim üretimi güncelliğini giderek artırmaktadır. Bu enzimlerden en önemlilerinden bir tanesi kitinazdır.

Çalışmamızda kullanılan bakterinin kitinaz enzimi üretme ve antifungal özelliklerinin araştırması yapılmıştır. Bu sebeple lor peynirinden izole edilen *Lactobacillus coryniformis* suşunun sırasıyla; kitinaz enzim üretme aktivitelerinin test edilmesi, antifungal özelliklerinin literatür çalışması yapılarak endüstriye uygunluğunun araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamız sonucunda kültür koleksiyonumuzda var olan ve %99 oranında tanılanmış *Lactobacillus coryniformis*'ten üretilen ekstraselüler kitinaz enzimi optimum pH'sı 6, optimum sıcaklığı 70°C olarak bulunmuştur. Yapılan antifungal testler ışığında *Alternaria alternata*'nın gelişimini önemli ölçüde durdurduğu belirlenmiştir. *L.coryniformis*'in pH aralığının çok geniş olması, optimum sıcaklığının yüksek olması ve *Alternaria alternata*'ya karşı göstermiş olduğu üstün antifungal özelliğinden dolayı endüstriye sunulabileceği yapılan çalışmayla teyit edilmiştir.

2018, 42 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kitinaz, *Lactobacillus coryniformis*, *Alternaria alternata*

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINATION OF CHITINASE ACTIVITY OF *Lactobacillus coryniformis* OBTAINED FROM LOR CHEESE AND ITS EFFECT ON *Alternaria alternata*

Selda Nur HACIABDULLAHOĞLU

Atatürk University
Institute of Science and Technology
Department of Agricultural Biotechnology
Branch of Enzyme and Microbial Biotechnolog

Supervisor: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

The use of bacteria in biotechnology has increased in the recent years. Due to their fast-growing biochemical effects, unlike plants and animals, bacteria are the most important organisms that provide a balance between the living organisms and in ecosystems. A very important characteristic of bacteria that affects human life today is their contributions to biotechnology. A variety of biotechnological studies on the bacteria can be made and benefits and products can be obtained from these studies. Therefore, the enzyme production, which is obtained from bacteria and has a very high industrial size, is increasingly becoming popular. One of the most important of these enzymes is chitinase.

In this study, the chitinase enzyme production and antifungal properties of this bacterium were investigated. Accordingly, it was aimed to test the chitinase enzyme production activities of *Lactobacillus coryniformis* strains isolated from lor cheese and to investigate the suitability of its antifungal properties to industry by conducting literature review. As a result, it was found that the extracellular chitinase enzyme produced by *Lactobacillus coryniformis*, which is present in our culture collection and diagnosed at 99%, had an optimum pH of 6 and an optimum temperature of 70°C. It was determined that the performed antifungal tests significantly inhibited the development of *Alternaria alternata*. Our results confirmed that *L.coryniformis* can be presented to the industry due to its wide pH range, its high optimum temperature and its superior antifungal properties against *Alternaria alternata*.

2018, 42 pages

Keywords: Chitinase, *Lactobacillus coryniformis*, *Alternaria alternata*

TEŞEKKÜR

Çalışma sürecimde göstermiş olduğu her türlü yardım ve katkılarından dolayı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Elif TOZLU'ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca her zaman yanımda olan yüksek lisans arkadaşlarıma sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tez sürecimde bana, gelişmiş laboratuvar imkânları ile teknik destek sağlayan Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Arş. Gör. Nasibe TEKİNER ve tüm teknik personellerine teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen, beni bugünlere getiren değerli aileme minnettar olduğumu bildirmek isterim.

Selda Nur HACIABDULLAHOĞLU

Şubat, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Laktik Asit Bakterileri ve <i>Lactobacillus</i> Cinsi.....	1
1.1.1. <i>Lactobacillus coryniformis</i>	2
1.2. Enzimler	2
1.2.1. Enzimlerin yapısı ve özellikleri.....	3
1.2.2. Enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımı	5
1.3. Kitinaz Enzimi.....	7
1.3.1. Kitinazların rolü	8
1.3.2. Kitinazların uygulama alanları	8
1.3.2.a. Kitooligosakkaritlerin üretimi	9
1.3.2.b. Diğer uygulama alanları	9
1.4. Funguslar	9
1.4.1. <i>Alternaria alternata</i>	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	19
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	20
3.1.3. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı	20
3.1.4. pH aktivitesi için kullanılan tamponlar	21
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Mikroorganizma izolasyonu ve tanısı	21
3.2.2. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi	22

3.2.3. Çalışmada kullanılan bakteri kültürlerinin muhafazası.....	23
3.2.4. Bakterilerin inokülasyonu	23
3.2.5. Enzimin saflaştırılması	23
3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçülmesi	23
3.2.6.a. Substratın hazırlanışı	24
3.2.6.b. Renklendirme çözeltilisinin hazırlanışı	24
3.2.7. Enzimin optimum pH değerinin saptanması	24
3.2.8. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması.....	25
3.2.9. Bakteri izolatlarının petride antifungal aktivitelerinin belirlenmesi	25
4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR.....	26
4.1. Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi	26
4.2. <i>Lactobacillus coryniformis</i> 'in <i>Alternaria alternata</i> Üzerine Etkisinin İncelenmesi	27
4.3. Kitinaz Aktivite Sonuçları.....	30
4.4. <i>L.coryniformis</i> 'den Elde Edilen Kitinaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları	31
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	33
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat
ATP	Adenozin Trifosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
EC	Enzim Komisyonu
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten sabiti
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterileri
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NCBI	Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
nm	Nanometre
rpm	Dakikada devir sayısı
sp.	Species (tür, tekil)
TCA	Trikloroasetik asit
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U/mg	Unit/miligram
unit/μl	Unit/mikrolitre
v/v	Hacim/Hacim (volüme/volüme)
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzimlerin genel yapısı	4
Şekil 1.2. Anahtar-kilit modeli	4
Şekil 1.3. İndüklenmiş uyum modeli	5
Şekil 1.4. Kitinaz enziminin 3 boyutlu yapısı.....	8
Şekil 4.1. Lactobacillus coryniformis bakterisinin koloni görünümü.....	26
Şekil 4.2. Lactobacillus coryniformis'in gram boyama görüntüsü.....	27
Şekil 4.3. Bakteri izolatının petri denemelerinde patojen fungusun gelişimine etkisi	29
Şekil 4.4. Bakteri izolatının petri denemelerinde patojen fungusun gelişimine etkisi	30
Şekil 4.5. L.coryniformis'ten elde edilen ekstraselüler kitinaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	31
Şekil 4.6. L.coryniformis'ten ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan kitinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanları ve üretiminde kullanılan mikroorganizmalar	6
Çizelge 4.1. <i>Alternaria alternata</i> 'nın (ET57) petriye aktarıldıktan sonraki 3. Gün ölçümleri	28
Çizelge 4.2. <i>Alternaria alternata</i> 'nın petriye aktarıldıktan sonraki 4. Gün ölçümleri	28
Çizelge 4.3. <i>L.coryniformis</i> 'in optimum pH absorbans (A) değerleri.....	31
Çizelge 4.4. <i>L.coryniformis</i> 'in optimum sıcaklık absorbans değerleri.....	32

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji; hücre ve doku kültürlerinden veya mikrobiyal metabolitlerden, biyokimya, mikrobiyoloji ve mühendislik bilimlerinin kullanılarak istenilen ürünlerin elde edildiği multidisipliner bir bilim dalıdır. Biyoteknolojideki gelişmelerin insan yaşamındaki yeri insanlık tarihi kadar eski bir geçmişe dayanmaktadır. Eski çağlara ait kitaplardan ve yazıtlardan elde edilen bilgilerden şarap yapımı ve hamurun mayalanması gibi biyolojik olayların insan yaşamında önemli bir yer tuttuğu anlaşılmıştır. Moleküler genetik ve moleküler biyoloji bilimlerinde 1950'li yıllarda başlayan gelişmeler 1970'li yıllarda biyoteknoloji alanını da etkisi altına almaya başlamıştır. Moleküler düzeyde yapılacak genetik çalışmalarla, üretkenliğin ve verimliliğin artırıldığı yeni ürünlerin oluşturulduğu bir çalışma alanı olan modern biyoteknoloji alanı gelişmeye başlamıştır (Yeşilbağ 2004).

Mikrobiyal biyoteknoloji; farklı ekosistemlerden endüstriyel enzim üreticisi mikroorganizmaların izolasyonu, taranması, moleküler ve konvansiyonel yöntemlerle tanımlanması, seçilen enzimlerin mikrobiyal proses teknolojileri ile optimizasyonu ve üretimi, saflaştırılması, immobilizasyon süreçlerinin geliştirilmesine dayanan bilim dalıdır. Proteomik, genomik ve yönlendirilmiş mutagenез yöntemleri kullanarak hedef enzimlerde ve proteinlerde yapı-işlevin geliştirilmesi, rekombinant mikroorganizmalarla enzim üretilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca farklı çevre ve habitatlardan kültüre alınamayan mikrobiyal kaynaklar endüstriyel amaçlarda değerlendirilmektedir (Temiz 2000).

1.1. Laktik Asit Bakterileri ve *Lactobacillus* Cinsi

Laktik asit bakterileri (LAB) endüstriyel yönden önemli mikroorganizmalar olup, endüstriyel gıda fermantasyonlarında çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar. Özellikle gelişme ortamındaki karbonu metabolize etmeleri sonucunda ara ürün olarak laktik asit üretmeleri, bu mikroorganizmaların gıda alanında kullanımının yaygınlaşmasına sebep

olmaktadır. LAB'nin bu özellikleri gıda hammaddelerinde asitliğin artmasına yol açmakta ve bu durum gıdaların raf ömrünü önemli ölçüde uzatması açısından yararlı olmaktadır. LAB asit oluşturmalarına ek olarak gıdalarda starter kültür olarak kullanıldıklarında doku, tat, besleyici değer gibi bazı ürün özelliklerine de katkıda bulunmaktadırlar (Gheytanci *et al.* 2010).

Lactobacillus'un en önemli özelliği karbohidratları parçalayarak laktik asit üretmesidir. Sporsuz, hareketsiz, kapsülsüz, anaerop veya mikraerofil, gram pozitif, görünümüleri polimorf yapılı, tekli bazen kısa zincirler, kalın bazen ince şeklinde olan bakterilerdir. Zenginleştirilmiş besiyerlerinde, pH 5-6 ve 5 –55°C aralıklarında daha iyi ürerler (Anonim 2016b).

1.1.1. *Lactobacillus coryniformis*

Gram pozitif bir bakteri olup, kısa veya kromad çubuklar şeklinde tekli, çiftli veya kısa zincir halinde oluşum gösterirler. Optimum büyüme sıcaklığı 30-37°C dir. Genel olarak büyüme faktörü gereksinimleri pantotenik asit, niasin, riboflavin, biyotin, p-aminobenzoik asittir (Hannes and Hertel 2009).

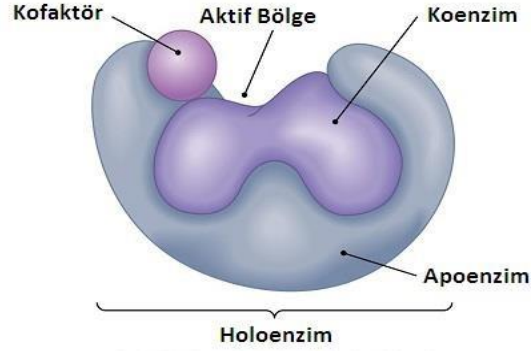
1.2. Enzimler

Enzimler canlı organizmalar aracılığıyla üretilen katalitik özellik gösteren protein yapılı moleküllerdir. Enzimler canlı organizmaların yaşamsal faaliyetlerini yerine getirmek için gerekli pek çok biyokimyasal reaksiyondan sorumludurlar. Bütün proteinler gibi enzimlerin de yapı taşı, aminoasitlerdir. Enzimleri diğer protein moleküllerinden ayıran özellik, biyokimyasal reaksiyonları katalizleme özelliğidir. Bu özelliği sayesinde birçok çalışma alanında kullanılmaktadır (Enzyme Technical Association 2001; Wolfson *et al.* 2008).

1.2.1. Enzimlerin yapısı ve özellikleri

Katalitik RNA moleküllerinin bir bölümü dışında bütün enzimler proteinden meydana gelmiştir. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarının bütünlüğü ile alakalıdır; bir enzim denatüre edilirse veya alt ünitelerine parçalanırsa katalitik aktivitesi çoğunlukla kaybolur; bir enzim aminoasit bileşenlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi daima bozulur. Bu sebeple; enzim proteinlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları, katalitik aktiviteleri için önemlidir. Enzimler, diğer proteinler gibi 12.000'den 1.000.000 üzerine kadar farklılaşan moleküler ağırlığa sahiptirler (Nelson and Cox 2004).

Çoğu enzimler görev ve yapı bakımından iki farklı gruptan oluşmaktadır. Bunlar; “Apoenzim” ve “Kofaktör/Koenzim”dir. Apoenzim; enzimin sadece belirli reaksiyonları katalizleyen yani enzimin spesifikliğini belirleyen bölümüdür. Bu grup protein yapısında olduğu için ısı ile kolayca denatüre olabilmektedir. Bazı enzimler aktivite için, protein yapıyı meydana getiren aminoasit bileşiklerinden başka kimyasal komponente gereksinim duymazlar. Bazı enzimler ise kofaktör olarak adlandırılan bir ek kimyasal komponente gereksinim duyarlar. Kofaktör; ya Mn^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} Mg^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon ya da koenzim olarak adlandırılan metalloorganik veya organik kompleks bir moleküldür. En önemli yardımcı enzim grubu vitaminlerden oluşmaktadır. Koenzimlerin enzim proteinine çok sıkı bir şekilde, kovalent olarak bağlı olup enzim proteininden ayrılmayanları ‘prostetik grup’ olarak adlandırılırlar. Koenzim (Prostetik grup) ve apoenzim birlikteliğine “Holoenzim” (aktif enzim) denir (Şekil 1.1) (Pandey and Ramachandran 2006).



Şekil 1.1. Enzimlerin genel yapısı (Anonim 2016b)

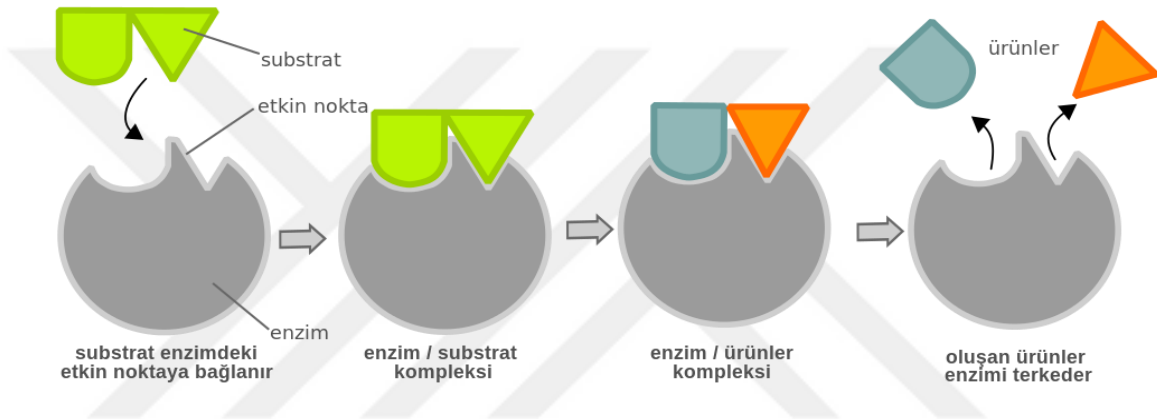
Enzimin etki ettiği bileşiğe "substrat" adı verilir. Enzimler substratları “ürün” olarak adlandırılan farklı moleküllere dönüştürebilmektedir. Doğadaki tüm süreçler önemli ölçüde enzimlere ihtiyaç duymaktadırlar. Tüm katalizörlerde olduğu gibi enzimler de bir reaksiyonun aktivasyon enerjisini azaltacak faaliyette bulunur (Kuzu 2008).

Reaksiyonun aktivasyon enerjisindeki azalmalar, daha hızlı bir sürece neden olmakta ancak enzimler ne reaksiyonları değiştirebilmekte ne de katalize ettikleri reaksiyonlar tarafından tüketilmektedir. Bununla birlikte enzimler diğer katalizörlere göre daha spesifik aktivite göstermektedir. 1894’te Emil Fischer tarafından ileri sürülen anahtar-kilit modelinde, substratın enzimin aktif bölgesine uygun şekilde bağlandığı kabul edilir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Anahtar-kilit modeli (Anonim 2017a)

Diğer model indüklenmiş-uyum modelidir (Şekil 1.3). Bu modelde ise enzim substrat yokluğunda serbest şekilde bulunur. Enzim ortama gelen substrat varlığında, substratını katalize edebilmek için uygun halde bağlayacak şekilde bir değişikliğe uğrar. Enzimin bağlı olduğu substrat parçalanıp reaksiyon sona erdiğinde enzim hiçbir değişime uğramadan çıkar. Ve bunun sonucunda enzimler bu özelliklerden dolayı tekrar tekrar kullanılabilirler. Enzimler genellikle geri dönüşümlüdür yani çift yönlü çalışabilirler (Nelson and Cox 2004; Açıklık ve Çelebi 2006; Anonim 2016c).



Şekil 1.3. İndüklenmiş uyum modeli (Anonim 2017b)

1.2.2. Enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımı

Enzimlerin canlılar dışında da faaliyet göstermesi önemini oldukça artırmaktadır. Günümüzde enzimler ilaç, gıda, ve kimya endüstrisinde, boya, dericilik, ve temizlik maddeleri üretimi gibi konularda, biyoteknoloji ve biyoloji bilim dallarında, veterinerlik, tıp ve tarım alanlarında çokça kullanılmaktadır. Örneğin ticari enzim preparatlarından gıda endüstrisinin yanı sıra gıda analizleri yapılırken de yararlanılmakta, endüstriyel atık ve artıklarının değerlendirilmesinde de yararlanılarak bu atıkların yol açabileceği çevre kirlenmesinin önüne geçilmeye çalışılmaktadır (Anonim 2015a). Çizelge 1.1’de bazı enzimlerin kullanım alanı ve üretimlerinde kullanılan mikroorganizmalardan birkaç örnek gösterilmektedir.

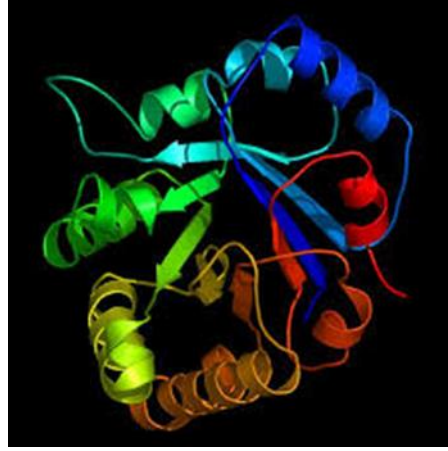
Çizelge 1.1. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanları ve üretiminde kullanılan mikroorganizmalar (Anonim 2015a)

Enzim	Kullanım Alanı	Mikroorganizma
α-amilaz	Maltoz ve dekstrinin yıkılması Glikoz şurubu Unun zenginleştirilmesi Leke çıkarıcı	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
β-glukanaz	β -glukanın parçalanması yoluyla biranın berraklaştırılması	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus subtilis</i>
Katalaz	İçeceklerin bozulmasını önlemek için	<i>Aspergillus niger</i>
Selülaz	Atıkların değerlendirilmesi Deterjan katkı maddesi	<i>Penicillium spp.</i>
Glikoz izomeraz	Glikoz, Früktoz dönüşümü	<i>Aspergillus spp</i> <i>Streptomyces spp.</i>
Glikoz oksidaz	Biyosensor	<i>Aspergillus Niger</i>
Laktaz	Laktozsuz gıda üretimi Laktoz Peynir altı suyu	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Lipaz	Deterjan katkı maddesi Yağların parçalanması Peynir Endüstrisi	<i>Aspergillus oryzae</i>
Pektinaz	Meyve suyu ekstraksiyonu Meyve suyu ve şarap berraklaştırılması	<i>Erwinia spp.</i>
Proteaz	Deri Endüstrisi, Deterjan katkı maddesi, et ekstraksiyonu Sindirime yardımcı	<i>Bacillus Subtilis</i>
Renin	Peynir Endüstrisi	<i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Mucor spp.</i>
Sukraz	Şekerleme Endüstrisi	<i>Saccharomyces spp.</i>

1.3. Kitinaz Enzimi

Kitinazlar organizmalar içerisinde oldukça yoğun bir dağılıma sahiptir. Bu dağılım; bakteriler, yüksek bitkiler, mantarlar, kabuklular, böcekler ve bazı omurgalıları içerir (Jeuniaux 1966; Flach *et al.* 1992).

Kitinazların bu organizmalardaki işlevleri farklılık gösterir (Shubakov and Kucheryavykh 2004). Bitkiler, funguslara karşı savunma amaçlı kitinaz üretebilirler. Kitinaz, fungal patojenlerin misellerini parçalama yeteneğine sahiptir. Kitinaz üreten genin bitkilere aktarılması sonucunda oluşan transgenik bitkiler insektisid ve fungisid özellikler kazanmaktadır. Böylece transgenik bitkiler kendileri için patojen böceklerle ve funguslarla savaşabilme yeteneğine sahip olurlar. Doğal genotipinde kitinaz genine sahip olan bazı bitkilerin olduğu da bilinmektedir. Kitinazların yüksek organizasyonlu mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından sentezlenebilme özelliği vardır. Soya fasülyesi, domates, buğday kepeği gibi bitkilerden izole edilip, birçok mikrobiyal türlerin bünyesinde barınabilmektedir. *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Vibrio*, *Aeromonas* ve *Streptomyces* (özellikle *S. griseus*) *Serratia* vb. türleri pek çok kitin bağlayan protein ihtiva edebilir ve kitinolitik enzim salgılayabilirler. Bunların kitini benzer olarak parçalayabildiği ve ekstraselüler çevreye salgıladıkları gözlemlenmiştir (Bassler *et al.* 1991; Tomassen *et al.* 1992; Watanabe *et al.* 1992; Suzuki *et al.* 1998). Kitinaz üreten bakteriler kitini, enerji ve karbon (C) kaynağı olarak kullanırlar (Roberts and Selitrennikoff 1988; Goodey 1990; Leah *et al.* 1995) ve diğer karbohidrazilara benzer olarak 3 enzim kompleksi içerir. Bunlar; ekzokitinaz, endokitinaz ve kitobiaz olarak bilinirler (Dubourdieu *et al.* 1985).



Şekil 1.4. Kitinaz enziminin 3 boyutlu yapısı (Anonim 2017c)

1.3.1. Kitinazların rolü

Farklı organizmalar farklı çeşitlilikte hidrolitik enzimleri üretebilirler. Bu enzimler farklı substrat spesifiklikleri gösterir ve diğer özellikleri ile çeşitli fonksiyonlar üstlenirler. Bakterilerde kitinazlar; beslenme ve mantar, protozoa ve omurgasızlara karşı parazitlikte görev alırlar. Bununla birlikte morfogenezin de kapsamındadırlar. Kitinazlar, bitki ve omurgalıların savunma mekanizmalarında da görev alırlar. Böcek zararlılarının biyolojik kontrolünde kullanılan baculoviruslar patojenik etki olarak kitinaz üretirler (Gooday 1995). İnsan serumunda da kitinaz aktivitesi tanımlanmıştır (Aerts *et al.* 1996; Escott *et al.* 1996).

1.3.2. Kitinazların uygulama alanları

Kitinazlar çeşitli preparasyonları ile birçok endüstri ve tarım alanındaki uygulamalarda kullanılabilirler (Shaikh and Deshpande 1993; Patil *et al.* 2000). Bu uygulama alanlarında en fazla kullanılan yöntemlerin başında bitkilerdeki patojenik mantarlara karşı biyokontrol, kitin oligosakkaritlerinin üretimi ve tek hücre proteini üretimi gelmektedir (Patil *et al.* 2000).

1.3.2.a. Kitoooligosakkaritlerin üretimi

Kitoooligosakkaritler bitki savunmasında oluşan maddelerdir ve tıpta önemli kullanım alanları vardır. Örneğin; kitoheksoz ve kitoheptoz anti-tümör etkisi gösterebilirler. *Vibrio alginolyticus*'tan elde edilen kitinaz koloidal kitinden kitopentoz ve kitotrioz oluşturur (Murao vd. 1992). GlcNAc tek başına anti-inflamatuar bir maddedir. İnsan vücudunda glukozdan sentez edilir ve glikoprotein ve glikozaminoglikanlara bağlı bir şekilde bulunur. Bu maddenin sentetik olarak elde edilmesi için ise yüksek miktarlarda ekzo-kitinaz ve N-asetilglukozaminidazlara ihtiyaç vardır (Aloise *et al.* 1996).

1.3.2.b. Diğer uygulama alanları

Tek hücre proteini üretiminde ve biyoteknolojide kullanılan birçok kitin türevinin elde edilmesinde kitinazlar kullanılmaktadır (Revahmoiseev and Carroad 1981; Kumar 2000).

1.4. Funguslar

Tipik olarak filamentli (ipliksi), ökaryotik yapıdaki canlı gruplarıdır. Hücre duvarına sahip olan Fungusların neredeyse hepsi hareketsizdir. Fotosentetik pigment ihtiva etmezler, bu sebeple besinlerini diğer canlıların ürettiği organik maddelerden absorpsiyon yoluyla alırlar. Aerobik olarak geliştikleri için enerji ihtiyaçlarını organik maddelerin oksidasyonu aracılığıyla karşılarlar. Şekil, davranış ve hayat devri bakımından birbirine uyum sağlamayan pek çok organizma ihtiva ettikleri için kesin bir tanım yapmak oldukça güçtür. Bu güne kadar seksen bin fungus türü tanımlanmıştır. Fungusların yaşam ortamı oldukça farklılıklar gösterir. Bir bölümü suculdur ve tatlı sularda yaşar. Denizlerde yaşayan birkaç fungus türü de mevcuttur. Ancak büyük çoğunluğu ölü bitkisel atıklarda ve toprakta yaşar. Bununla birlikte bitki, hayvan ve insanlarda parazit olanları mevcuttur (Palta *et al.* 2010).

1.4.1. *Alternaria alternata*

Bitkilerde 380'den fazla yaprak lekesi ve diğ er hastalıklara sebep olduğu belirlenen bir k f mantarıdır. Bitki parçalarında yaprak lekelerine, çürümelere ve patlamalara neden olan fırsatçı bir patojendir. Hayatta kalmak için nemli ve sıcak ortama ihtiyaç duyar. Bağışıklık sistemi bozulmuş insanlarda astıma ve üst solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olur (Feng *et al.*2007).

Lor peynirinden izole edilen *Lactobacillus* cinsi bakteriler arasından lor peynirinden izole edilen *Lactobacillus coryniformis* izolatının kitinaz aktivitesi belirlenmiştir. Endüstriyel boyutta araştırılıp bakterinin bitki hastalıklarına neden olan *Alternaria alternata*  zerine olan etkileri araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Magnusson *et al.* (2001); *Lactobacillus coryniformis subsp.* antifungal aktivite spektrumu *Coryniformis* cinsi Si3 incelendi. Suş, kalıplara karşı ikili kültür agar plak testlerinde güçlü engelleme aktivitesine gösterdiği tespit edilmiştir. *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *Penicillium roqueforti*, *Mucor hiemalis*, *Talaromyces flavus*, *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum* ve *F. Sporotrichoides*'dir. Mayonez *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* ve *Saccharomyces cerevisiae*'ye karşı oldukça zayıf bir aktivite gözlemlendi. Büyüme ortamına etanol ilavesi antifungal aktivite düşüşünü engellemiş ve artış göstermiştir. pH değerlerinde 3.0 ve 4.5 arasında maksimum aktivite gözlemlendi, ancak pH 4.5 ile 6.0 arasında bir seviyeye ayarlandığında hızla bir düşüş gösterdi ve daha yüksek pH değerlerinde ortamdan kayboldu. pH değerinin başlangıç değerine (pH 3.6) yeniden ayarlanmasından sonra antifungal etkinlik tamamen kazanılmıştır. Bu, *L. coryniformis subsp. coryniformis*'ten proteinli bir mantar önleyici bileşik üretiminin ilk raporudur.

Torres *et al.* (2016); Pek çok vitaminin çeşitli gıdalarda bulunmasına rağmen, dengesiz diyetler, yetersiz beslenme veya gıdaların yetersiz alınması bazı ülkelerde vitamin eksikliğinin nedenidir. B12 vitamini (Kobalamin), archea ve bakteriler tarafından doğal olarak üretilen kompleks bir birleşiktir. Bu çalışmada silajdan izole edilmiş heterofermentatif bir suş olan *Lactobacillus coryniformis*'in suda çözünen vitaminleri, B₁₂ vitamini olarak sentezleyebildiği bildirilmiştir.

Redondo *et al.* (2017); *Lactobacillus coryniformis* CECT5711'in (Lc) Hepatit A virüsü (HAV) ile aşılanan sağlıklı gönüllülerin özgül bağışıklığı üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Probiyotiklerin bağışıklık sistemi üzerinde, hastalık halinde yoğun etkisi varken sağlıklı durumda immünolojik homeostaz altında değişiklik olmadığından probiyotik etkisi gözlenmemiştir. Spesifik HAV antikorları, PRO1'de yüksek değer gösterirken PRO2'de ortalama değer göstermiştir. Sitokin konsantrasyonların da hiçbir fark bulunamamasından dolayı *L.coryniformis* katkılı Probiyotiklerin kullanılabilirliğine ilişkin net sonuç bulunamamıştır.

Yi *et al.* (2016); XN8 türü, kadavradan izole edilmiş ve 16S rRNA gen dizisine göre *Lactobacillus coryniformis* olarak tanımlanmıştır. XN8 tarafından üretilen bakteriyosinlerden biri amonyum sülfat çökeltmesi ve bir dizi kromatografik kolon ile arıtılmış ve laktosin XN8-A (LXA) olarak adlandırılmıştır. LXA ısı, pH ve depolama stabiliteleri göstermiştir. Bununla birlikte, proteazlara da duyarlı olduğu belirlenmiştir. LXA'nın, birçok ilaca dirençli suşlar ve *Listeria monocytogenes* dahil olmak üzere hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler üzerinde geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip olduğu belirlenmiştir. Hem *Staphylococcus aureus* hem de *Escherichia coli* için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) 6.85 µg / mL dir. LXA, büyüme eğrisi ve zaman öldürme tahlili ile hücre liziz olmadan bakteri öldürme potansiyeline sahiptir. Bu araştırma LXA'nın gıda endüstrisinde biyolojik koruyucu olarak potansiyel olduğunu göstermektedir.

Datta *et al.* (2017); Gastrointestinal ve *Lactobacilli*, kadın genital sisteminin normal komensalsidir. Düşük virülansı sebebiyle bu bakterilerin fırsatçı enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. *Lactobacillus coryniformis* plöro-pulmoner enfeksiyon vakası olarak bildirilmiş ve önceden bildirilen 14 plevra-pulmoner enfeksiyona neden olan laktoobilitik vakası incelenmiştir. Hastada metastaz ile küçük hücreli karsinom gözlenmişti. Tüm 14 olguda immünsupresyon, kanser veya kronik hastalık gibi önceden var olan risk faktörleri tespit edilmişti. Kullanılacak antimikrobiyal ajanların seçiminde fikir birliğine varılamamıştır. Laktobasillerin farklı türleri dahil edildi. Mevcut duyarlılık verileri *Lactobacilli* türlerinin eritromisin, ampisilin, entarisin ve klindamisin'e karşı daha duyarlı olduğunu ve seftriakson, siprofloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazole dönüştüğünü göstermiştir.

Schachtsiek *et al.* (2004); *Lactobacillus coryniformis*'in agregasyon fentlerinin fenotipli karakterizasyonu, DSM 20001T suşunun *Escherichia coli* K88, *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* ile birlikte toplandığını, ancak diğer insan patojenleriyle birlikte bulunmadığını ortaya koymuştur. *E. coli* K88'in hücreleri, koagregatlarda ve agregalarda 24 saate kadar canlı kaldıkları gözlenmiştir. Isıya (15 dakika boyunca 85°C) ve proteinaz K'ya karşı duyarlılık göstermiştir. Koagregasyon arttırıcı faktör (Cpf)

saflaştırılmış ve gen tespit edilmiştir. Aminoasit dizilimi bilinen işlevleri olan proteinlere önemli bir benzerlik göstermedi. Bu sonuçlar, aminoasit dizisi analizinin sonuçlarıyla birlikte, Cpf'nin bazı patojenlerin birlikte toplanmasına aracılık eden *L. coryniformis*'in yeni bir yüzey proteini olduğunu önermektedir.

Martin *et al.* (2005); Keçi sütü peynirinden izole edilen *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, geniş spektrumlu bir antimikrobiyal aktivite sergilediği gözlenmiştir. Laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit ve reuterin (3-hidroksipropionaldehid, 3-HPA) de dahil olmak üzere laktik asit bakterileri ile bağlantılı antagonistik bileşikler üretme kabiliyeti araştırılmıştır. Bu suş tarafından bakteriyosinler veya hidrojen peroksit üretimi tespit edilememiştir. Bu suş, gastrointestinal sistemde mevcut olanları tekrarlayan koşullara maruz bırakıldıktan sonra bağırsak hücrelerine yapışan özellikler sergilemiş ve hayatta kalmak için yüksek aktivite göstermiştir. Bu özellik reuterin üreten kabiliyetinin konakçı yararı için kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Olivares *et al.* (2006); Gastrointestinal parametrelerdeki değişiklikler, bağırsak kolonizasyonu ve tolerans, probiyotik için öne sürülen başlıca hedeflerden bazılarıdır. İki probiyotik suş olan *Lactobacillus gasseri* CECT5714 ve *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 içeren fermente bir ürünün, kan ve fekal parametreler üzerine olan etkisini araştırmak için 30 sağlıklı erişkin içeren çift kör, randomize, plasebo kontrollü bir insan klinik çalışması gerçekleştirildi. Gönüllüler rasgele iki gruba ayrıldı; biri standart bir yoğurt, diğeri de benzer bir süt fermantasyonu ürünü olan *Lactobacillus delbreuckii subsp. bulgaricus* yoğurt suşu, *L. gasseri* CECT5714 ve *L. coryniformis* CECT5711 probiyotik suşlarının bir kombinasyonu ile yer değiştirmiştir. Sonuç olarak, probiyotik gruba atanan gönüllüler bağırsak alışkanlıklarında belirgin bir iyileşme olduğunu gözlenmiştir. Araştırma, probiyotiklerin sağlıklı yetişkinler üzerinde olumlu bir etkisi olabileceğini ortaya koymuştur.

Schoug *et al.* (2006); Dondurarak kurutma genellikle laktik asit bakterilerini stabilize etmek için kullanılan yöntemdir. Bakteri türleri, hücre yoğunluğu, dondurma hızı, liyoprotektan diğer işlem parametreleri dahil olmak üzere dondurularak kurutmanın

sağkalımını etkileyen birçok faktör gözlenmiştir. *Lactobacillus coryniformis* Si3 geniş antifungal aktiviteye sahiptir. Bu suş, diğer ticari olarak üretilmiş mantar önleyici laktik asit bakteri suşlarıyla karşılaştırıldığında düşük strese daha duyarlı, dondurarak kurutma süresinin daha az olduğu düşünülmektedir. Kuru ürünün su aktivitesi ve dondurarak kurutma için seçilen termofiziksel özellikler; su kristalleşme derecesi ve maksimum derecede dondurulmuş konsantre amorf fazın (Tg') cam geçiş sıcaklığı belirlenmiştir. Suyun kristalleşmesi derecesi azalmış ve son su aktivitesi sukroz konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak artmıştır.

Wiwat *et al.* (1999); *Bacillus circulans* No.4.1 suşunun kitinaz üretilip bu kitinazın geniş pH aralığında (6,0- 12,0) kitini hidroliz ettiğini, eğer kitinaz kodlayan gen *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*'ye transfer edilirse böceklerle biyolojik savaşta ciddi toksisite artışına neden olacağını tespit etmiştir.

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

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

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

San-Lang *et al.* (2002); topraktan iki *Bacillus subtilis* suşu izole etmişlerdir. Deniz atıklarının kitinini içeren ortamda aerobik olarak büyüyen bu suşların, kültür

ortamından elde edilen ham fungusitler, patojenik mantar *Fusarium oxysporum* üzerinde antifungal aktivite göstermiştir. *B. subtilis* W118 ve *B. subtilis* W113 suşları, büyüme ortamına sırasıyla %0,75 ve %1,75 kitin eklendiğinde maksimum antifungal aktivite göstermiştir. Bu iki suş tarafından üretilen ham fungusitlerin inhibitör etkileri, pH değişimi ile önemli ölçüde etkilenmemiştir. Bu ham fungusitlerin önemli ölçüde termotabil olduğu ve inhibitör aktivitelerinin, 100°C’de 30 dakika ısıtılma tabi tutulduğunda bile bir kısmının korunduğu belirtilmiştir. Ayrıca, deniz atıklarındaki kitinin kullanımı, *B. subtilis* ile kitinolitik enzim üretimi ilk kez belirlenmiştir.

Çağlar (2005); bitki biyokontrolünde oldukça fazla kullanılan bir küf mantarı olan *Trichoderma atroviride*’nin ürettiği kitinaz enzimi incelemiştir. Patates-dekstroz agar üzerinde yetiştirilen *T. atroviride*’den kitinaz indüksiyonu, *T. atroviride*’nin yer değiştirme yöntemi kullanılmıştır. Santrifüj işlemi sonunda çökelti atılmış ve üst sıvı ham filtrat olarak isimlendirilip, çöktürme işleminin uygulanacağı ham filtratta enzim aktivitesi ve protein miktarı tayini yapılmıştır. Spesifik kitinaz aktivitesi 2,339 U/mg olarak bulunmuş ve çalışmanın devamında kitinaz enzimine amonyum sülfat tuzu, aseton, etanol ve trikloroasetik asit gibi farklı çöktürme yöntemlerinin etkisi de incelenmiştir.

Chang *et al.* (2010); yaptıkları çalışmada antifungal kitinaz üreten bakterilerin izolasyonu için substrat olarak kullanılmak üzere, karides ve yengecin işlenmesi sonrasında ortaya çıkan atıkları kaynatıp ezerek karides ve yengeç kabuğu tozu elde etmişlerdir. Topraktan izole edilen *Bacillus subtilis* NPU 001 suşu, kitinaz için ana karbon kaynaklarından olan karides ve yengeç kabuğu tozunun %2’sini ihtiva eden ortamda geliştirmişlerdir. Sıralı kromatografi ile saflaştırılan kitinazın (2 mg ml⁻¹), *Fusarium oxysporum*’un hif uzantısını inhibe ettiği belirlenmiştir. Diğer bilinen bakteriyel kitinazlar ile karşılaştırıldığında 001 NPU’nun kitinazının, koloidal kitinin enzimatik hidrolizi ile oluşan kitotriose’nin üretimi ve mantar bitki patojenlerine karşı antifungal aktivite içermesi gibi kendine özgü özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Chandrasekaran *et al.* (2012); çalışmalarında *Bacillus subtilis*’tan hücre dışı kitinaz

saflaştırmışlardır. Öldürücü konsantrasyon (LC50), *Spodoptera litura* Fab'ın birinci, ikinci ve üçüncü larva dönemlerinde kitinaz kullanılarak elde edilmiştir. Kitinazın 48 saat içerisinde 6 IM konsantrasyonda en yüksek seviyede insektisidal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 6 IM konsantrasyonda ($P < 0,05$) besinsel endekslerinin de önemli ölçüde etkilendiği saptanmıştır. Çalışmalarında, kitinaz ile konakçı bitki yapraklarındaki artan ölüm oranı, larva büyümesi ve ağırlık gibi tehlikelerin azaltılabileceği belirlenmiştir.

Bagherabadi *et al.* (2017); *Drimia maritima* (squill), tarihsel olarak önemli bir şifalı bitkidir. 2016 baharında İran'daki Boyer-Ahmad ve Kohgiluyeh Vilayetindeki squill bitkilerinde kahverengi ve sonunda nekrotik hale gelen küçük sarı yaprak lekeleri gözlemlendi. Bu mantar enfekte olmuş yapraklardan izole edilmiştir. Filogenetik ve morfolojik analizlere dayanılarak *Alternaria alternata* olarak tanımlandı. Patojenite testleri, *A. alternata*'nın yeni gözlemlenen yaprak nokta hastalığının nedensel ajanı olduğunu tespit edilmiştir. Bu *A. alternata*'nın dünyadaki *D. maritima* üzerindeki yaprak lekesinin ilk raporudur.

Pan *et al.* (2017); Bu makalede, taze armut meyveleri ve *Alternaria* tarafından enfekte edilenler (*A. alternatif*), hücre duvarı kimyasal kompozisyonlarındaki değişiklikleri göstermek için konfokal Raman mikroskopikroskopi (CRM) ile çalışılmıştır. İlk olarak, taze ve enfekte olmuş meyvelerin hücre duvarının Raman spektrumu, mikron düzeyinde mekansal çözünürlük ile toplandı ve daha sonra, hücre duvarındaki kimyasal bileşimlerin etiketsiz yerinde görüntülenmesi haritalandırıldı. Sonuçlar, hücre duvarı sinyal yoğunluğunda, özellikle de alternatif enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında önemli değişiklikler olduğunu gösterdi. Sonuçlarımız, CRM'in herhangi bir kimyasal işleme gerek kalmadan mantar enfeksiyonunun neden olduğu hücre duvarı kompozisyon değişikliklerinin tanımlanması için yararlı bir araç olduğunu doğrulamıştır. İlk kez, mevcut araştırma bir patojen ile konakçı arasındaki etkileşimli ilişkiyi araştırmak için fitopatolojide CRM uygulamış ve böylece hücresel düzeyde patojen-konakçı etkileşimlerinin derinlemesine incelenmesine yeni bir olanak sağlamıştır.

Nielsen *et al.* (1999); *Rhizoctonia solani* ve *Pythium ultimum*'a karşı antagonistik olarak

şeker pancarı ve arpanın rizosferinden izole edilen *Pseudomonas fluorescens*'in 12 izolatu, dış kaynaklı kitin olmayan ortamda geliştiğinde kesikli kültürde kitinolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Zhang *et al.* (2000); *Bipolaris sorokiniana*'nın biyokontrol ajanı *Stenotrophomonas maltophilia* C3 suşu ile kitin içeren sıvı ortamda kitinaz üretmişlerdir. Kitinaz, amonyum sülfat çöktürmesi ve kitin afinite kromotografisi ile sıvı kültürden kısmı saflaştırılmıştır. Kitinaz aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 4,5-5,0 ve 45-50°C olarak belirlenmiştir. Kitinaz aktivitesi Hg²⁺ ve Fe³⁺ ile inhibe edilmişken, diğer metal iyonları ve enzim inhibitörleri ile inhibe edilememiştir. Sonuç olarak C3 suşunun, en az iki antifungal etkinlik gösteren kitinaz enzimi ürettiği belirlenmiştir.

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

Vaidya *et al.* (2003); *Alcaligenes xylosoxydans*'tan kitinaz enzimi elde etmişler ve SDSPAGE ve gel filtrasyon tekniği ile enzimin moleküler ağırlığını yaklaşık 44-45 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzim, 50°C'de ve pH 5'te optimum aktivite göstermiştir. 5mM Cu²⁺ ve Na⁺ kitinaz aktivitesini %25 inhibe ederken, aynı konsatrasyonlarda Mg²⁺, Ca²⁺ ve Ba²⁺ etki etmemiştir. Ayrıca saflaştırılan enzimin, *Aspergillus niger* misellerini parçaladığı bulunmuştur.

Radjacommare *et al.* (2004); bitki büyümesini teşvik edici kitinaz üreten bakteri suşları ile bitkilere muamele edilmiş ve bitkilerin zararlı bir mantar olan *R. solani* ile enfeksiyondan korunduklarını gözlemişlerdir. Çalışmada kitinaz negatif olarak kullanılan suşun fungal patojene karşı herhangi bir koruma kapasitesi olmadığı

belirlenmiş ve fungal patojene karşı aktif elementin kitinaz olduğu net bir şekilde anlaşılmıştır. Böylece aktivitesi ve moleküler özellikleri amaca uygun olan bir kitinaz geni bitki büyümesini teşvik eden bakterilere klonlanarak bitki gelişim ve korunması sağlanmıştır.

Okay (2005); kitinaz A enzimini kodlayan geni (*chiA*) Trabzon ili çevresinden izole edilmiş olan *Serratia marcescens* Bn10'dan PCR yoluyla çoğaltılmış ve klonlayarak *E. coli/Bacillus* vektörlerine (pNW33N ve pHT315) aktarmıştır. Klonlanan *chiA* geninin nükleotid dizisi analiz edilmiştir. Dizi GenBankası'na sunulmuş ve DQ165083 numarasını almıştır. Yerli izolat *S. marcescens* Bn10 tarafından farklı kültür koşullarında kitinaz üretimi incelenmiştir. Kitinaz üretimi için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 30°C ve 7,5 olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın sonunda 10 mM EDTA'nın enzimi %4 oranında inhibe ettiği, 10 mM Co⁺²'nin ise aktiviteyi % 20 oranında artırdığı bulunmuştur.

Chang *et al.* (2007); *Bacillus cereus*'un bitki büyümesini uyarıcı bileşiklerin, deniz atıklarından kitinin kullanılmasıyla elde edildiğini bildirmiştir.

Şenol *et al.* (2014); Bu çalışmada, Türkiye'de bazı bitkilerin yaprakları ve kök rizosferlerinden izole edilen bakteri kültürlerinden türetilen 158 izolat, tütün üzerinde yapılan aşırı duyarlılık testine dayalı olarak fitopatojenik olmadığını teyit ederek seçilmiştir. Sebzelerin köklerinin parçalanmasına neden olan patojenik mantarlar olan *Fusarium culmorum*'a karşı antifungal etkinlik testi yapıldı. Buna göre, antifungal aktiviteye sahip 31 izolat üzerinde kitinaz enzim aktivite testi yapıldı ve aralarında en yüksek aktivite sergileyen *Bacillus subtilis* TV-125 izolatu seçildi. Çalışmanın sonucunda, saflaştırılmış kitinaz enzimi *Bacillus subtilis* TV 125A tüm sonuçlar pozitif olmasına rağmen, özellikle etkili olduğu, dört fungal maddeler üzerinde test edilmiştir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, lor peynirinden çeşitli örnekler alınmıştır. Enzim aktivitesi işlemlerinde kimyasallar ve kitler kullanılmıştır. Bakteri izolasyonu için gereken özel ve genel besiyerleri hazırlanmıştır.

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Spektrofotometre (UV-1201V)

Vorteks (Wisemix Vm-10, KOREA)

Hassas Terazı (Shimadzu, JAPAN)

Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE)

Santrifüj (Therma Mr23 İ, GERMANY)

Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)

Elektroforez Akım Sağlayıcı (Biometra Pack P25, GERMANY)

Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)

Mikrodalga Fırın (Arçelik, TÜRKİYE)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Jel Görüntüleme Sistemi (Biorad Gel Doc 2000, ITALY)

Steril Kabin (Safefast Classic 212 359, SINGAPORE)

Çalkalayıcı (Shimadzu, PHILIPPINES)

Manyetik Karıştırıcı (Heidolph, GERMANY)

pH Metre (Ohaus Starter3000, USA)

Derin Dondurucu (Nuaire -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)

İnkübatör (Wisecube, KOREA)

Otoklav (Wiseclave Wac-47, KOREA)

Mikroskop (Bresser, GERMANY)

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

MRS Agar (Merck), Nutrient Broth (Merck), PDA (Merck), NaCl (Merck), Ethanol (Merck).

3.1.3. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

MRS Agar: Hassas terazide tartılan 68,2g MRS Agar hazır haldeki ılık 1 L dH₂O içerisine ilave edilerek çözünene kadar karıştı. Uygulamanın büyümesi için 121°C’de 15 dk otoklavlandı(Anonim2017e).

Nutrient Broth: 1 L dH₂O içerisine 8g Nutrient Broth hassas terazide tartılarak eklenmiştir. Daha sonra otoklavda 121°C’de 15 dk steril edilerek kullanıldı.

Patato Dextrose Agar: Dehidre besiyeri, 39,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, 121°C'de otoklavda 15 dakika sterilize edilip, steril petri kutularına 12,5'er mL dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı-kahve renklidir ve buzdolabında 2 ay depolanabilme özelliğine sahiptir

Stok Besiyeri: 0,65g nutrient broth karışımına 36 ml gliserol ilave edildikten sonra toplam hacim 100 ml olacak şekilde saf su ilave edilmiştir. Tam çözünme olması için manyetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri otoklavda steril edildi. Aseptik olarak 2 ml’lik steril eppendorf tüplere 1,2 ml konularak hazırlandı (Saygılı vd 2006).

%70’lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün (Sigma) üzerine hacmi 100 ml oluncaya kadar saf su eklendi. -20°C’de muhafaza edildi.

3.1.4. pH aktivitesi için kullanılan tamponlar

a. Sodyum asetat tamponu

pH 2,0-6,0 aralığındaki kitinazın aktivitesini belirlemek nedeniyle kullanılmıştır. 0,82 g sodyum asetat 0,1 M asetat tamponu için tartılmış ve 100 ml dH₂O ile tamamlanmıştır. Optimum pH değerlerini ayarlayabilmek için HCl ve/veya 0,1 M'lık NaOH kullanılmıştır.

b. Tris-HCl tamponu

pH 7,0-10 Aralığındaki kitinaz aktivitesini belirlenmesi için kullanılmıştır. 0,121 g Trizma base 10 mM Tris-HCl tamponu için tartılmış ve 100 ml suda çözünerek hazırlanmıştır. Uygun pH değerini elde etmek üzere konsantre NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanılmıştır.

c. Karbonat tamponu

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

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizma izolasyonu ve tanısı

Lor peyniri örneğinden 10 g tartılıp 100 ml serum (fizyolojik tuzlu su) içerisinde vorteks ile homojenize edilmiştir. Dilüsyon işlemi ile örnekten 1'er ml alınarak içerisinde 9 ml fizyolojik tuzlu su bulunan cam tüplere aktarım yapılmıştır. Vorteksleme

işlemi yapıldıktan sonra 10^{-6} 'dan 0,1 ml alınarak bakterinin nutrient agara yayma yöntemi ile ekimi gerçekleştirilmiştir. 35°C'de 24-48 saat boyunca inkübe edildikten sonra tek kolonilerden çizim usulü ekim yapılarak bakteri saflaştırılmıştır.

3.2.2. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi

Bakterilerin morfolojileri boyutları çok küçük boyutlarda olduklarından dolayı bireysel yapıları sadece mikroskoplarla incelenebilir. Bu sebeple, katı ya da sıvı besiyerlerinde saf bir şekilde geliştirilen hazırlanmış bakteri preparatları spesifik boyalar aracılığıyla işlem yapılarak inceleme yapılabilir. Mikroskoptaki incelemelerde, bakterilerin boyutları, spor durumu, boyanma özelliği (Gram (-) veya (+), vb.) özelliklerinin varlığı belirlenir. (Arda 2000; Harley and Prescott 2002).

a. Hücre morfolojisinin belirlenmesi: Her bir izolattan örnek hazırlanmak üzere kristal violet ile basit boyama yapıldı ve mikroskop altında görüntülerine bakılarak sonuçlar elde edildi (Temiz 2000; Harley and Prescott 2002).

b. Hücre boyutlarının belirlenmesi: Basit veya negatif boyama işlemi yapılan preparatlardaki izolatların immersiyon objektifinde oküler mikrometre yardımı ile hücre boyutları hesaplanmıştır (Leloğlu ve Erdoğan 1979; Temiz 2000).

Bakteri izolatlarının hücre duvarlarındaki farklılığının belirlenmesi için gram boyama testine tabi tutulmuştur (Tarakçıoğlu 2016). Bu testte aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

- a) Lam üzerine bir damla saf su damlattır ve daha sonra üzerine besiyerinde 24 saat geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu alınarak iyice yayımı yapılır.
- b) Ateşten geçirilerek fikse edilir.
- c) İlk olarak kristal viyoleto boyası ile 1 dk muamele edilir ve saf su ile 30 sn yıkanır.
- d) Lügol ile 1 dk muamele edilir ve % 96'lık etil alkol ile yıkanır.
- e) Tekrar saf sudan geçirilerek son kez safranin boyası uygulanır.
- f) Preparat yıkanıp kurutulur.
- g) Mikroskop altında incelenir.

3.2.3. Çalışmada kullanılan bakteri kültürlerinin muhafazası

Her bakterinin 24 saatlik saf kültüründen bir lop alınarak, içerisinde 500 µl %30'luk gliserol ve 500 µl LB Broth bulunan eppendorf tüplere aktarılıp etiketlenir. Vorteks cihazında vortekslenerek -80°C'de sonraki çalışmalar için muhafaza edilir.

3.2.4. Bakterilerin inokülasyonu

MRS Agar'da gelişme gösteren bakteriler, Nutrient Broth'a inoküle edilerek bakterilerin sıvı kültür ortamına aktarılması sağlanacaktır. 35°C'de 120 saat etüvde inkübasyona bırakılacaktır.

3.2.5. Enzimin saflaştırılması

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

3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Kitinaz enzimi aktivitesi ölçülürken her aralıkta elde edilen çökeleklere ve çöktürme sonrası elde edilen süpernatantlara aktivite tayini yapılmıştır. Bunun için; 1. 200 µL enzim çözeltisi ile 500 µL substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika 37°C'ye

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

3.2.6.a. Substratın hazırlanışı

Substrat 0,02 M Sodyum sitrat çözeltisine %0.05'lik kitin ilave edilerek hazırlanmıştır. Çözelti içerisinde yer alan 0,02 M Sodyum sitrat tamponu ise; 5,88 g Sodyum sitrat tartılarak, distile su ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra pH 6,0'a ayarlanarak hazırlanmıştır.

3.2.6.b. Renklendirme çözeltisinin hazırlanışı

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

3.2.7. Enzimin optimum pH değerinin saptanması

Kitinaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için;

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

Farklı pH değerlerine sahip (pH 2,0-11,0) tamponlar kullanılarak içerisinde %0,05 kitin bulunan substrat çözeltileri hazırlanmıştır.

3.2.8. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C'lik sıcaklıklar seçilmiştir. Sıcaklık ölçümlerinin saptanması için su banyosu kullanılmıştır. Aktivite tayininin yapılabilmesi için 100 µL enzim ve 250 µL substrat karıştırılarak standart aktivite ölçümü yapılmıştır.

3.2.9. Bakteri izolatlarının petride antifungal aktivitelerinin belirlenmesi

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

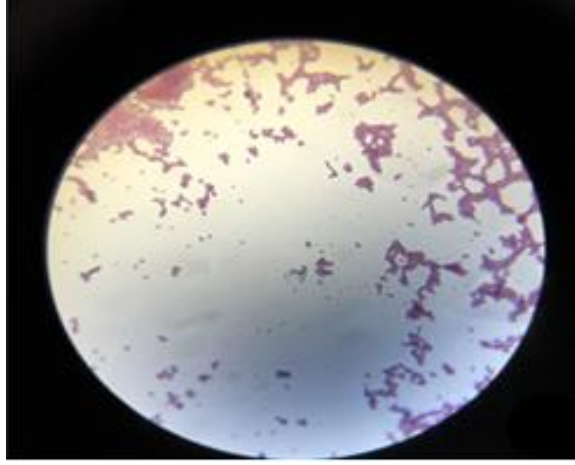
4. ARAşTIRMA ve BULGULAR

4.1. Kültür zelliklerinin Belirlenmesi

Bakterinin kültürel özellikleri incelendiğinde; bunların MRS Agar zerindeki gelişme sonuçları ve her bir izolatın olgun koloni oluşturma süreleri dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır. Bakterimizin koloni görüntüsü şekil 4.1 ve şekil 4.2’de gösterilmiştir. Saflaştırılan *Lactobacillus coryniformis* bakterisi ile çalışmamız devam etmiştir.



şekil 4.1. *Lactobacillus coryniformis* bakterisinin koloni görünümü



Şekil 4.2. *Lactobacillus coryniformis*'in gram boyama görüntüsü

4.2. *Lactobacillus coryniformis*'in *Alternaria alternata* Üzerine Etkisinin İncelenmesi

L.coryniformis'in antifungal özelliğinin incelenmesi için çukur açma yöntemi kullanılarak *Alternaria alternata*' ya uygulanmıştır. Her bir doz (0-20, 20-40, 40-60, 60-80) için 3 tekerrür uygulanmıştır. İncelemeler sonucunda elde edilen değerlerin ortalama zonu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *Alternaria alternata*'nın (ET57) petriye aktarıldıktan sonraki 3. Gün ölçümleri

Patojen	Uygulama	Doz	Tekerrür	Zon (cm)	Yarıçap (cm)
ET57 <i>Alternaria alternata</i>	Çukur	0-20	1	1.2	3.5
			2	2.9	3.5
			3	1.2	2.0
		Ortalama		1.7	2.8
		20-40	1	2.2	5.1
			2	1.7	1.9
			3	2.2	4.4
		Ortalama		2.0	3.8
		40-60	1	1.7	3
			2	1.8	4.9
			3	1.5	2.5
		Ortalama		1.6	3.4
		60-80	1	2.2	4.4
			2	2.1	4.3
			3	1.3	4.7
		Ortalama		1.8	4.4

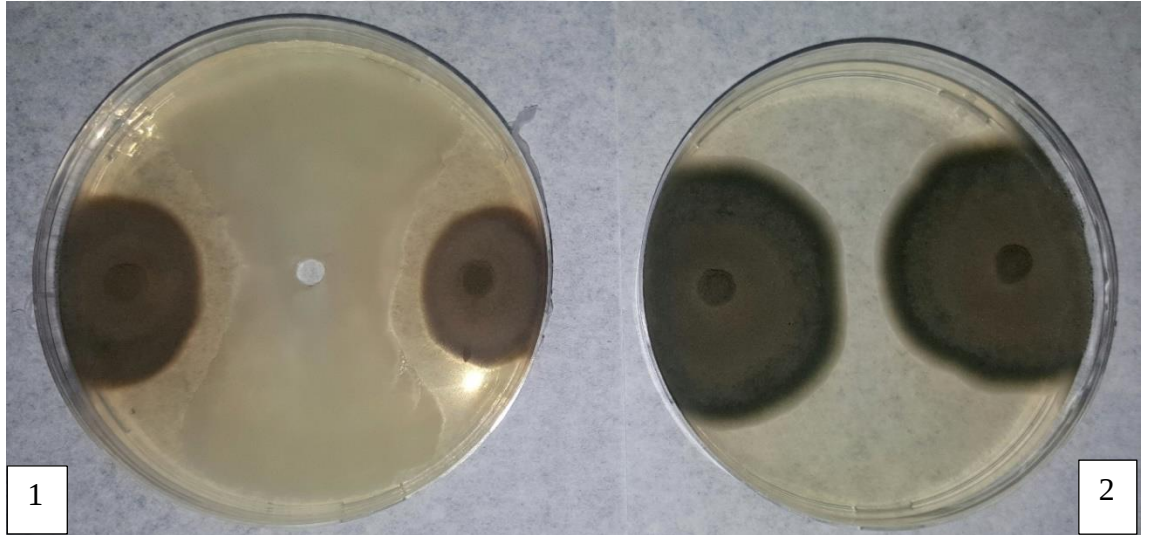
Çizelge 4.2. *Alternaria alternata*'nın petriye aktarıldıktan sonraki 4. Gün ölçümleri

Patojen	Uygulama	Doz	Tekerrür	Zon (cm)	Yarıçap (cm)
ET57 <i>Alternaria alternata</i>	Çukur	0-20	1	1.2	3.5
			2	1.9	3.5
			3	1.2	1.9
		Ortalama		1.4	2.9
		20-40	1	2.1	5
			2	1.7	3.7
			3	1.9	4.1
		Ortalama		1.9	4.2
		40-60	1	1.7	3
			2	1.3	4.8
			3	1.8	4.8
		Ortalama		1.6	4.2
		60-80	1	1.1	5.2
			2	1.7	5
			3	1.3	5.2
		Ortalama		1.3	5.1

Petri denemelerinde *Lactobacillus coryniformis*'in patojen fungusa karşı antifungal özellikleri gözlenmiştir. 3. ve 4. günde yapılan ölçümler sonucunda; kontrol grubundaki

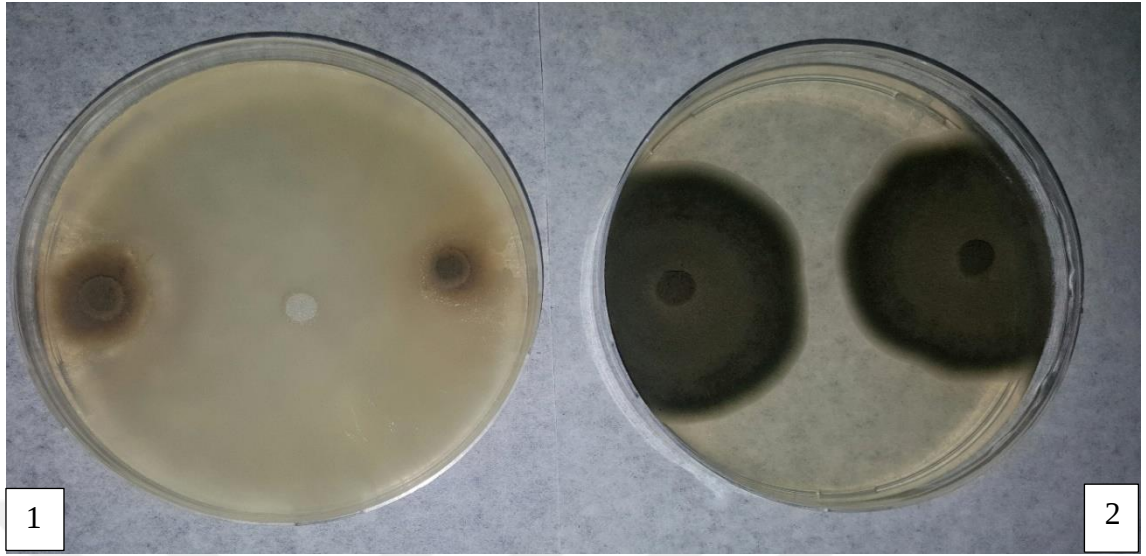
fungusun gelişimi normal seyir gösterirken, *L.coryniformis*'den kısmi saflaştırılan (0-40aralığında) kitinaz enziminin bulunduğu petride fungal diskin gelişiminin önemli ölçüde engellendiği ve bazı tekerrürlerde ise (3.tekerrür 0-20 aralığında) tamamen durdurduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4) .

Şekil 4.3'teki petride, kontrole karşı *Alternaria alternata*'nın gelişimi incelenmiştir. Kontrol grubundaki fungusun gelişimi normal seyrinde devam etmiştir. Uygulamamız sırasında *L.coryniformis*'den kısmi saflaştırma yaptığımız kitinaz enzimi ihtiva eden 1. Petride patojen fungusun gelişiminin yarı yarıya engellendiği görülmüştür.



Şekil 4.3. Bakteri izolatının petri denemelerinde patojen fungusun gelişimine etkisi

1: *L.coryniformis*'in fungusun gelişimi üzerine etkisi 2: Kontrol uygulaması



Şekil 4.4. Bakteri izolatının petri denemelerinde patojen fungusun gelişimine etkisi

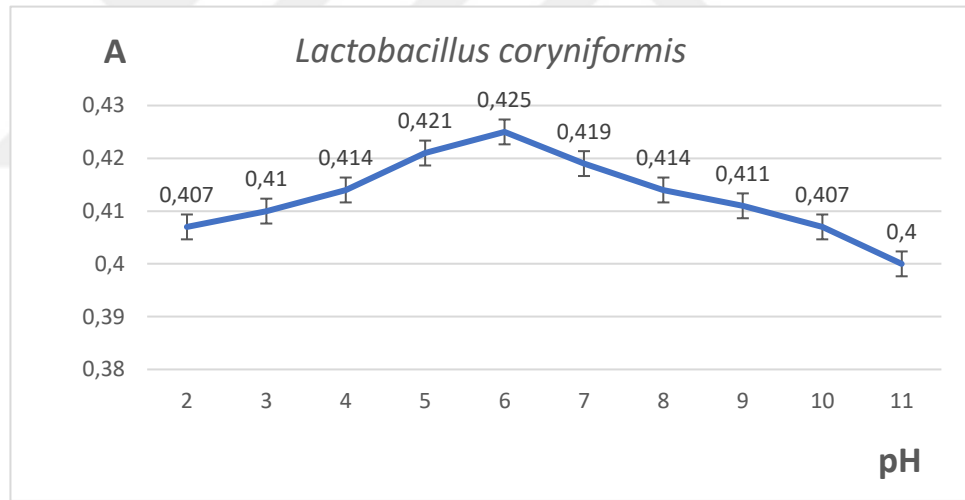
Şekil 4.4'te görüldüğü gibi kontrol grubunda ki patojen fungusun gelişimi normal seyirde devam etmiştir. Bunun yanı sıra *L.coryniformis*'den kısmi saflaştırılan kitinaz enzimi inoküle edilen petri plağında patojen fungusun gelişiminin neredeyse tamamen durduğu gözlemlenmiştir.

4.3. Kitinaz Aktivite Sonuçları

L.coryniformis'den saflaştırılan kitinaz enziminin optimum pH'sını belirlemek için spektrofotometrede 540 nm de ölçümler yapılmıştır (Çizelge 4.3). Saptanan sonuçlar ile aktivitesi hesaplanmış ve 'Aktivite-pH' grafikleri çizilmiş, sonuçlar Şekil 4.5'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *L.coryniformis*'den saflaştırılan kitinaz enzimi için optimum pH 6 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3. *L.coryniformis*'in optimum pH absorbans (A) değerleri

pH	1. DENEME (A)	2. DENEME(A)	3. DENEME(A)	ORTALAMA
2	0,406	0,408	0,407	0,407
3	0,41	0,409	0,412	0,41
4	0,412	0,416	0,414	0,414
5	0,423	0,425	0,417	0,421
6	0,424	0,426	0,425	0,425
7	0,418	0,42	0,419	0,419
8	0,418	0,416	0,41	0,414
9	0,415	0,41	0,408	0,411
10	0,408	0,407	0,406	0,407
11	0,4	0,4	0,4	0,4



Şekil 4.5. *L.coryniformis*'ten elde edilen ekstraselüler kitinaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

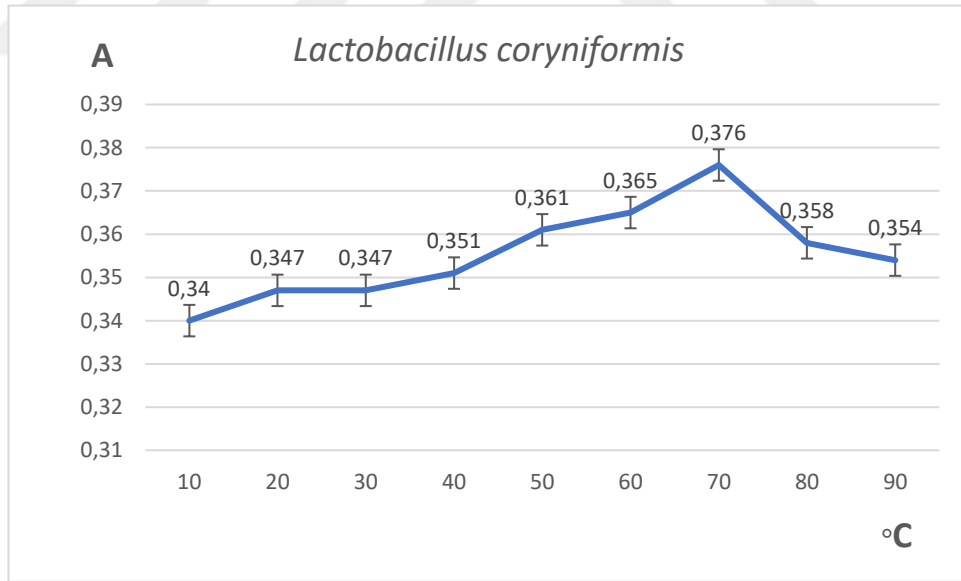
4.4. *L.coryniformis*'den Elde Edilen Kitinaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları

L.coryniformis'den elde edilerek saflaştırılan kitinaz enziminin optimum sıcaklıklarını tespit etmek için gerekli ölçümler yapılmıştır (Çizelge 4.4). Ölçümler 10-90°C aralığında yapılmıştır ve elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplanmış olup “Aktivite-°C”

grafiği çizilmiştir (Şekil 4.6). Elde edilen bulgulara göre *L.coryniformis*'e ait kitinaz enziminin optimum sıcaklığı 70°C olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.4. *L.coryniformis*'in optimum sıcaklık absorbans değerleri

SICAKLIK °C	1. DENEME (A)	2. DENEME(A)	3. DENEME(A)	ORTALAMA
10	0,341	0,339	0,34	0,34
20	0,378	0,316	0,348	0,347
30	0,375	0,319	0,348	0,347
40	0,358	0,35	0,345	0,351
50	0,41	0,313	0,362	0,361
60	0,41	0,321	0,365	0,365
70	0,43	0,34	0,358	0,376
80	0,4	0,317	0,359	0,358
90	0,39	0,319	0,353	0,354



Şekil 4.6. *L.coryniformis*'ten ekstraselüler olarak üretilip saflaştırılan kitinaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarları Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Anabilimdalı kültür koleksiyonunda bulunan *Lactobacillus coryniformis* bakterisinin ve Bitki koruma bölümündeki Bitki Klinik Laboratuvarı koleksiyonundan alınan *Alternaria alternata* üzerindeki zon oluşturma etkisi incelenmiştir.

Lactobacillus coryniformis'ten üretilip saflaştırılan kitinaz enziminin optimum pH'larını bulmak için pH 2.0-11.0 aralığı taranmıştır. Çalışma sonunda *L.coryniformis*'in optimum pH değeri Şekil 4.3'te de gösterildiği gibi 6.0 olarak tespit edilmiştir. Literatürde bu konuda farklı çalışmalar mevcuttur.

Yakubi *et al.* (1986) ve Watanabe *et al.* (1992)'a göre pek çok kitinazın asidik olduğu belirtilmiştir. Okay (2005) yaptığı çalışmada *S.marcescens* kitinaz enziminin pH 4.0-9.0 aralığında aktivite gösterdiğini söylemiş, Ma *et al.* (2012) *Gliocladium catenulatum*'dan izole ettikleri ve saflaştırdıkları kitinaz enziminin aktivitesi pH 4.0-5.0 aralığında stabil olduğunu söylemişlerdir.

Vaidya *et al.* (2003), yaptıkları çalışmada elde ettikleri *Alcaligenes xylosoxydans*'ın kitinaz enziminin optimum pH'sının 5; McClery *et al.* (1987), *Bacillus pumilis*'ten ticari kitosanazlar (Chitosanase BP [MJ]) elde etmişlerdir ve optimum pH'sının 5-6,5 olduğunu belirtmiştir. Zhang *et al.* (2000), *Bipolaris sorokiniana*'nın biyokontrol ajanı *Stenotrophomonas maltophilia* C3 suşu ile kitin içeren sıvı ortamda kitinaz üretmişlerdir. Ürettikleri enzimin optimum pH'sının 4,5-5,0 arasında olduğunu belirtmiştir. Yapılan bu çalışmalar bizim sonucumuzu destekler niteliktedir. Çalışmamız sonucuna göre bu enzimin endüstriye sunulması durumunda, diğer enzimlere göre bioreaktör ortam şartlarına daha iyi adapte olacağı kesindir. Hem asidik hemde bazik substratta kolaylıkla ve hızlı geliştirileceği açıktır. Bu nedenle endüstride hızlı ve kısa süreli üretim için tercih nedeni olabilecektir.

Çalışmamızda *Lactobacillus coryniformis*'in optimum sıcaklığı 70°C olarak bulunmuştur. Bu yüksek sıcaklık toleransı kitinaz enziminin endüstriyel boyutta çalışılabilmesine olanak sağlayacaktır. Yüksek sıcaklık adaptasyonu üretim aşamasında kontrol edilemeyen sıcaklık artışlarına dayanıklı olduğu ve bu durumda çalışmasını sürdürebileceği ve daha fazla işlem gerekliliğini de ortadan kaldıracığı için tercih sebebi olacaktır. Kısmi saflaştırdığımız enzimimizin bu özellikleri ile piyasada kullanılan diğer enzimlere göre üstünlüğünden dolayı arz sebebidir.

Kitinaz enziminin optimum sıcaklığıyla ilgili olarak birçok çalışma yapılmıştır. Okay (2005), kitinaz A enzimini kodlayan geni (chiA) Trabzon ili çevresinden izole edilmiş olan *Serratia marcescens* Bn10'dan PCR yoluyla çoğaltılmış ve klonlayarak *E. coli*/*Bacillus* vektörlerine (pNW33N ve pHT315) aktarmıştır. Aktarılan kitinaz geninin optimum sıcaklığı 30°C olarak tespit edilmiştir.

Vaidya *et al.* (2003), çalışmalarında *Alcaligenes xylosoxydans*'tan kitinaz enzimi elde etmişler ve optimum sıcaklığını 50°C olarak bulmuşlardır. Zhang *et al.* (2000) *Bipolaris sorokiniana*'dan elde edilen ekstraselüler kitinaz enziminin optimum sıcaklığını 45-50°C olarak belirlerken; McClery *et al.* (1987) *Bacillus pumilis*'un optimum sıcaklığını 40-60°C olarak belirlenmiştir.

Ayrıca Yuli *et al.* (2004), *Bacillus sp.* 13.26 kitinaz enziminin 60°C, Kuzu (2008) *B. Thuringiensis* HBK- 51 suşunun kültür süpernatantından elde ettiği kitinaz enziminin 110°C, Ghasemi *et al.* (2011) *Bacillus pumilus* SG2 bakterisinin ChiL kitinaz enzimi için 40°C, Yakupoğlu (2009) *Serratia marcescens*'e ait kitinaz B enziminin 35°C, kitinaz C enziminin ise 33°C, Okay (2005) *S. Marcescens* Bn10'a ait kitinaz enziminin 45°C, Ma *et al.* (2012) *Gliocladium catenulatum*'dan izole ettikleri ve saflaştırdıkları kitinaz enziminin 60°C'de sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiği saptanmıştır. Enzimimiz yukarda açıklanan çalışmalara göre yüksek sıcaklıklara (70°C) dayanıklıdır.

Yaptığımız çalışma sonunda *Lactobacillus coryniformis*'in *Alternaria alternata* üzerindeki 3. ve 4. gün sonunda göstermiş olduğu etki Şekil 4.2'de belirtildiği gibidir.

Petride *Alternaria alternata* 'ya karşı yapılan antifungal aktivite testlerinde pozitif sonuç verdiğini gözlemledik. Bu testler ışığında İzolatın yüksek kitinaz aktivitesine sahip olduğu ve bu sebeple *Alternaria alternata*'ya karşı anti fungal aktivite gösterdiği saptadık.

Pasquale *et al.* (2016), yaptığı çalışmada da Laktik asit bakterisi olan *L. plantarum* suşlarının geniş spektrumlu antifungal aktivitesi gözlenmiştir. Sonuç olarak *L. Plantarum*'um *P. Chrysogenum*, *P.expansum* ve *Cladosporium spp.* gibi funguslarda güçlü bir antifungal aktivitesi göstermiştir. Yapılan bu çalışma bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Kim *et al.* (2002) *Botrytis cinerea* fungusun hücre duvarında lizozomal etki yarattığını, Vaidya *et al.* (2003) saflaştırdıkları kitinaz enziminin *Aspergillus niger* misellerini etkisiz hale getirdiğini ve Ma *et al.* (2012) çeşitli patojenik bitki mantarlarının çimlenmesini ve hifal büyümesini engellediğini belirtmişlerdir.

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

Yan *et al.* (2011) *Bacillus subtilis* SL-13 kitinaz enziminin *Rhizoctonia solani*'ye, Sindhu and Dadarwal (2001) *Pseudomonas* suşlarından elde ettikleri kitinaz enziminin *Rhizoctonia solani* ve *Pythium aphanidermatum*'a, Nielsen *et al.* (1999), kitinolitik aktive gösteren *Pseudomonas fluorescens*'in 12 izolatın *Pythium ultimum* ve *Rhizoctonia solani*'ye karşı anti-fungal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Şenol vd (2014), yaptıkları çalışmada *Fusarium culmorum*'a karşı yapılan antifungal aktivite testlerinde pozitif sonuç almıştır. Antifungal testler ışığında 31 izolata kitinaz enzimi aktivite tayini yapılmıştır. Yapılan testler sonucunda izolatların yüksek kitinaz enzimi aktivitesine sahip olduğu ve bu sayede de *Fusarium culmorum*'a karşı anti

fungus aktivite gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen bulgular bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

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

Elde ettiğimiz sonuçları endüstriyel açıdan ele alacak olursak;

1. *Alternaria alternata*'ya karşı antifungal aktivite gösteren ve kitinaz enzimini üretebilen *Lactobacillus coryniformis* biyokontrol ajanı olarak tarımda kullanılabilir.
2. İzolatın ürettiği kitinaz enziminin ayrıca mantar enfeksiyonlarına karşı tıp alanında da uygulanabilirliği vardı.
3. Diğer yandan bu izolatın ürettiği kitinaz enziminin üstünlükleri nedeniyle çevre alanında yapılacak biyoremediasyon çalışmalarında alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir.
4. Yüksek sıcaklık adaptasyonu üretim aşamasında kontrol edilemeyen sıcaklık artışlarına dayanıklı olduğu için enzimimiz bu özelliği piyasada kullanılan diğer enzimlere göre üstünlüğü dolayısıyla endüstriyel açıdan avantaj sağlamayarak in situ ex situ çalışmalarına uygunluk göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Açikel, Y. ve Çelebi, B., 2006. "R. delemar ile Lipaz Üretimi." TÜBİTAK Projesi, MİSAG-282.
- Aerts, J. M. F. G., Boot, R. G., Renkema, G. H., *et al.*, 1996. "Chitotriosidase: a human macrophage chitinase that is a marker for Gaucher disease manifestation. In: Muzzarelli, R.A.A., editor. Chitin Enzymology. Vol.2. Atec Edizioni-Grottammare", p. 3-10.
- Aloise, P. A., Lumme, M., Haynes, C. A., 1996. "N-acetyl-d-glucosamine production from chitin waste using chitinases from *Serratia marcescens*. In: Muzzarelli R.A.A., editor. Chitin Enzymology, Vol.2", Grottammare: Eur. Chitin Soc., p. 581-594.
- Anonim, 2016a. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F889433CFFA79D6F5E6C1B43FF2AE88F745E500DEF>. (16.12.2016)
- Anonim, 2016b. <http://www.enzimler.gen.tr/enzim-yapisi.html>. (27.07.2016)
- Anonim, 2017a. <http://www.biyodoc.com/enzim/2.PNG>. (05.01.2017)
- Anonim, 2017c. <https://www.msxlab.org/forum/biyoloji/21021-enzim-nedir-enzimler-hakkinda.html>
- Anonim, 2017d. <http://uguner.trakya.edu.tr/genelbiyo-2/images/g2-2.htm>. (09.12.2017)
- Anonim, 2015a. <https://mustafagermec.files.wordpress.com/2015/03/enzimler-endc3bcstriyel-kullanc4b1m-alanlarc4b1-ve-c3bcetim-yc3b6ntemleri1.pdf>. (05.11.2015)
- Anonim, 2017e. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?> (20.12.2017)
- Anonim, 2017f. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?> (20.12.2017)
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46, 548s.
- Bagherabadi, S., Zafari, D., Amirabad, Y. M., and Woudenberg, J. H., 2017. First report of leaf spot caused by *Alternaria alternata* on *Drimia maritima*. Journal of General Plant Pathology, 83(6), 398-401.
- Barış, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatışı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Atatürk Üniversitesi.
- Bassler, B.L., Yu, C., Lee, Y.C. and Roseman, S., 1991. Chitin utilization by marine bacteria: Degradation and catabolism of chitin-oligosaccharides by *Vibrio furnissi*. J. Biol. Chem. 266: 24276-24286.
- Bhushan, B. and Hoondal, G.S., 1999. Effect of Fungicides, Insecticides and Allosamidin on a Thermostable Chitinase from *Bacillus* sp. BG-11. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 15, 403-404.
- Bohager, T., 2006. Enzymes:What the Experts Know!. USA, One World Press, 1042 Willow Creek Road Prescott, AZ 86301 800-250-8171.s:1-36.
- Chandrasekaran, R., Revathi, K., Nisha, S., Kirubakaran, S.A., Sathish-Narayanan, S. and Senthil-Nathan, S., 2012. Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. Pesticide Biochemistry and Physiology, 104, 65–71.

- Chang, C.T., Lo, H.F., Wu, C.J. and Sung, H.Y., 2007. Purification And Properties of Chitinase From Cabbage. *International Journal of Biochemistry*, 28, 707-715.
- Chang, W-T., Chen, M-L. and Wang, S-L., 2010. An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 945-950.
- Choi, Y. M., Suh, H. J., and Kim, J. M., 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry*, 20(4), 287-292.
- Coşkun, F., 2006. Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 2: 27-33
- Çağlar, Z., 2005. *Trichoderma Atroviride*'den Elde Edilen Kitinazın Kısmi Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Datta, P., Gupta, V., Mohi, G. K., Chander, J., and Janmeja, A. K., 2017. *Lactobacillus coryniformis* Causing Pulmonary Infection in a Patient with Metastatic Small Cell Carcinoma: Case Report and Review of Literature on *Lactobacillus* Pleuro-Pulmonary Infections. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 11(2), DE01.
- Dubourdieu, D., Desplanges, C., Villettaz, J.-C., and Ribereaugayon, P. 1985. *Carbonhydr. Res.* 144(2): 277.
- Enzyme Technical Association, 2001. *Enzymes a Primer on Use and Benefits Today and Tomorrow*. 1800 Massachusetts Avenue, N.W. Second Flor Washington, DC 20036. s.1-34.
- Favaloro, J., Treisman, R., Kamen, R., in Grosman, L., and Moldave, K. (eds)., 1980. *Methods in Enzymology*. Vol: 65, Academic Press, New York, p: 718.
- Feng, W., and Zheng, X. 2007. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. *Food control*, 18(9), 1126-1130.
- Flach, J., Plet, P.E., Jolles, P. 1992. What's the new in chitinase research? *Experientia*, 48: 701-716.
- Ghasemi, S., Ahmadian, G., Sadeghi, M., Zeigler, D.R., Rahimian, H., Ghandilia, S., Naghibzadeh, N. And Dehestani, A., 2011. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 225–231.
- Gheytanchi, E., Heshmati, F., Shargh, B. K., Nowroozi, J., and Movahedzadeh, F., 2010. Study on b galactosidase enzyme produced by isolated *lactobacilli* from milk and cheese. *African Journal of Microbiology Research*, 4(6), 454-458.
- Gooday, G. W., 1995, "Diversity of roles for chitinases in nature. In: Zakaria M.B., Wan Muda W.M., Abdullah M.P., editors. *Chitin and Chitosan*.", Malaysia: Penerbit Universiti Kebangsaan, p. 191-202.
- Goodey, G.W. 1990. The ecology of chitin degradation. *Adv. Microbial Ecol.* 11: 387-430.
- Hammes WP ve Hertel C., 2009. Genus I. *Lactobacillus Beijerinck* 1901. PD Vos, G. Garrity, D. Jones, NDKrieg, W. Ludwig, FA Rainey, K.-H. Schleifer, WB Whitman. *Bergey'nin Sistematik Bakteriyoloji El Kitabı*, Cilt 3: Firmicutes, Springer, 465-511.

- Kim, K-J., Yang, Y-J and Kim, J-G., 2002. Purification and Characterization of Chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36, No. 2, p. 185-189.
- Kleerebezem, M., Boels, I. C., Groot, M. N., Mierau, I., Sybesma, W., Hugenholtz, J., 2002. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling. *Journal of Biotechnology* 98: 199-213.
- Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., 2003. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 232-237.
- Kotan, R., Sahin, F., Demirci, E. and Eken, C., 2009. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium species* using PGPR strains. *Biological Control*, 50, 194-198.
- Kumar, M. N. V. R., 2000, "A review of chitin and chitosan applications", *React. Funct. Polym.*, 46: 1-27.
- Kuzu, S.B., 2008. Kitinaz Üreten *Bacillus* İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Leah, R., Tommerup, H., Svendsn, IB., Mundy, J. 1995. Biochemical and molecular characterisation three barley seed proteins with antifungal properties. *J. Biol. Chem.* 266: 1564 1573.
- Ma, G-Z., Gao, H-L., Zhang, Y-H., Li, S-D., Xie, B-Y. and Wu, S-J., 2012. Purification and characterization of chitinase from *Gliocladium catenulatum* strain HL-1-1. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 6(20), 4377-4383.
- Magnusson, J., and Schnürer, J., 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 1-5.
- Martin, R., Olivares, M., Marin, M. L., Xaus, J., Fernández, L., and Rodriguez, J. M., 2005. Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *International journal of food microbiology*, 104(3), 267-277.
- Mcclery, B.V. and Matheson, N.K., 1987. *Advances Carbonhydr. Chem.* 44, 147.
- Murao, S., Kawada, T., Itoh, H., Oyama, H., Shin, T., 1992, "Purification and characterization of a novel type of chitinase from *Vibrio alginolyticus*", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56: 368-369.
- Nelson, D. L, Cox, M. M., 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Chapter 6. W. H. FREEMAN, Fourth Edition.
- Nielsen, M.N. and Sorensen, J., 1999. Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 217-227.
- Okay, S., 2005. Cloning of chitinase a gene (chia) from *serratia Marcescens* Bn10 and its expression in coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*. Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Gómez, N., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J. A., and Xaus, J., 2006. Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *International journal of food microbiology*, 107(2), 104-111.

- Palta, Ş., Demir, S., Şengönül, K., Ömer, K. A. R. A., and Şensoy, H., 2010. Arbüsküler Mikorizal Funguslar (AMF) Bitki ve Toprakla İlişkileri, Mera Islahındaki Önemleri. Journal of Bartın Faculty of Forestry, 12(18), 87-98.
- Pan, T. T., Pu, H., and Sun, D. W., 2017. Insights into the changes in chemical compositions of the cell Wall of pear fruit infected by *Alternaria alternata* with confocal Raman microspectroscopy. Postharvest Biology and Technology, 132, 119-129.
- Pandey, A. and Ramachandran, S., 2006. Enzyme Technology: General Introduction, (A. Pandey, C. Webb, C.R. Soccol and C. Larroche, editörler), Springer Science and Business Media, Inc. And Asiatech Publishers Inc., New York, p 1-11.
- Patil, R. S., Ghormade, V. and Deshpande, M. V., 2000, "Chitinolytic enzymes: an exploration.", Enzyme Microb. Technol., 26: 473-483.
- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.O., Chet, I., Wilson, K.S. and Vorgias C.E., 1994. Crystal Structure of a Bacterial Chitinase at 2.3 oA Resolution. Structure, 2, 1169.
- Radjacommar, R., Kandan, A., Nandakumar, R. and Samiyappan, R., 2004. Association of the Hydrolytic Enzyme Chitinase Against Rhizoctonia solani in Rhizobacteria-treated Rice Plants. Journal of Phytopathology, 152, 365-370.
- Redondo, N., Nova, E., Gheorghe, A., Díaz, L. E., Hernández, A., and Marcos, A., 2017. Evaluation of *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 strain as a coadjuvant in a vaccination process: a randomised clinical trial in healthy adults. Nutrition & metabolism, 14(1), 2.
- Revahmoiseey, S. ve Carroad, P. A., 1981, "Conversion of the enzymatic hydrolysate of shelfish waste chitin to single-cell protein", Biotechnol. Bioeng., 23: 1067 1078.
- Roberts, W.K. and Selitrennikoff, C.P., 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. J. Gene Microbiol. 134: 169-176.
- Rogosa M., 1974. Genus I. *Lactobacillus Beijerkinck* 1901. Buchanan RE ve Gibbons NE, Bergey'nin Determinatif Bakteriyoloji El Kitabı , Sekizinci Baskı, Williams and Wilking Company, Baltimore, 576-593.
- Russo, P., Arena, MP, Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., and Spano, G., 2017. Geniş antifungal aktiviteye sahip *Lactobacillus plantarum*: hububat bazlı ürünlerin emniyet ve raf ömrünü artırmak için umut verici bir yaklaşım. Uluslararası gıda mikrobiyolojisi dergisi, 247: 48-54.
- San-Lang, W., Shih, I-L., Wang, C-H., Tseng, K-C., Chang, W-T., Twu, Y-K., Ro, J-J. and Wang, C-L., 2002. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. Enzyme and Microbial Technology, 31, 321–328.
- Saygılı, H., Şahin, F., ve Aysan, Y., 2006. "Fitobakteriyoloji." Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye.
- Schachtsiek, M., Hammes, W. P., and Hertel, C., 2004. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. Applied and environmental microbiology, 70(12), 7078-7085.
- Schoug, Å., Olsson, J., Carlfors, J., Schnürer, J., and Håkansson, S., 2006. Freeze drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3 effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. Cryobiology, 53(1), 119-127.

- Shaikh, S. A., Deshpande, M. V., 1993, "Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research", World J Microbiol. Biotechnol., 9(4): 468-475.
- Shubakov, A.A. and Kucheryavkh, P.S., 2004. Chitinolytic Activity of Filamentous Fungi, Applied Biochemistry and Microbiology, 40(5): 445-447.
- Sindhu, S.S. and Dadarwal, K.R., 2001. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. Microbiological Research, 156, 353–358.
- Sümengen, M., 2011. Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanakları. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Şenol, M., Nadaroğlu, H., Dikbaş, N., Kotan, R., 2014. Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 13,35.
- Tarakçoğlu, S., 2016. Erzurum Ilıca Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fenbilimleri Enstitüsü Atatürk Üniversitesi.
- Telefoncu, A., 1995 Ege Üniversitesi Basımevi. Bornova, İzmir. Chitinase. Methods <http://gmbe.mam.tubitak.gov.tr/tr/arastirma-alanlari/enzim-ve-mikrobiyal-biyoteknolojiler>
- Temiz, A., 2000. Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri. Hatiboğlu Yayınevi.
- Tomassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M. and Lazdunski, A., 1992. Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS. Microbiol. Rew. 103: 73-90.
- Torres, A. C., Vannini, V., Bonacina, J., Font, G., Saavedra, L., and Taranto, M. P., 2016. Cobalamin production by *Lactobacillus coryniformis*: biochemical identification of the synthesized corrinoid and genomic analysis of the biosynthetic cluster. BMC microbiology, 16(1), 240.
- Vaidya, R., Roy, S., Macmil, S., Gandhi, S., Vyas, P. and Chhatpar, H.S., 2003. Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes xylosoxydans*. Biotechnology Letters, 25, 715-717.
- Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., Ohnishi, K., and Tanaka, H., 1992. Structure of gene encoding chitinase D, *Bacillus circulans* Wild type 12, and possible homology of the enzyme to other procaryotic chitinase and class-3 plant chitinases. J.Bacteriol. 174: 408-414.
- Wiest, Peter. Wiese, Kurt; Jacobs, Michael R ., Morrissey, Anne B ., Abelson, Tom I., Witt, William. Lederman, Michael M., 1987. "Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromlu Bir Olguda Alternaria Enfeksiyonu: Olgu Sunumu ve İnvaziv Alternaria Enfeksiyonlarının Gözden Geçirilmesi". Bulaşıcı Hastalıkların Yorumları . Chicago Press Üniversitesi. 9 (4): 799-803.
- Wiwat, C., Siwayaprahm, P. and Bhumiratana, A., 1999. Purification and Characterization of Chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1. Current Microbiology, 39, 134-140.
- Yabuki, M., Mizushina, K., Amatatsu, T., Ando, A., Fujii, T., Shimada, M. And Yamashita, M., 1986. Purification and characterization of chitinase and

- chitobiose produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. anaerogenes. *Biotechnol Appl Biochem Biotechnology and Applied Biochemistry*, 32, 25-38.
- Yakupoğlu, M., 2009. *Helicoverpa Armigera*'dan İzole Edilen *Serratia Marcescens* Bakterisine Ait Kitinaz A, B ve C Genlerinin Klonlanması, Karakterizasyonu, Ekspresyonu ve Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.
- Yan, L., Jing, T., Yujun, Y., Bin, L., Hui, L. and Chun, L., 2011. Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(1) 128-134.
- Yeşilbağ, D., 2004. Tarımsal ve hayvansal ürünlerde modern biyoteknoloji ve organik üretim. *Uludağ University Journal of Faculty of Veterinary Medicine*, 23, 1-2-3, 157-162.
- Yeşilsu, A.F., Polat, A., 2013. "Su Ürünlerinin Bozulmasında Enzimlerin Rolü" *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 8(3) 10-21.
- Yi, L., Dang, J., Zhang, L., Wu, Y., Liu, B., and Lü, X., 2016. Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. *Food Control*, 67, 53-62.
- Yuli, E.P., Suhartono, T., Rukayadi, Y., Hwang, J.K. and Pyun, R.Y., 2004. Characteristics of Thermostable Chitinase Enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 147-153.
- Zhang, Z., Yuen, G.Y., Sarath, G. and Penheiter, A.R., 2000. Chitinases from the Plant Disease Biocontrol Agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Biological Control*, Vol. 91, No. 2, 204-211.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: Selda Nur

Soyadı: HACIABDULLAHOĞLU

Doğum Tarihi: 29.04.1993

Doğum Yeri: Çaykara-Trabzon

Medeni Hali: Bekâr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lise : Çaykara Çok Programlı Anadolu Lisesi (2007)

Lisans : Atatürk Üniversitesi

Ziraat Fakültesi (2011-2015)

Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi

Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü (2015-2017)

İŞ TECRÜBESİ

Rize Gıda Kontrol Laboratuvarı (2014) – Stajyer – Rize