

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***TRICHODERMA ATROVIRIDE'DEN ELDE EDİLEN
KİTİNAZİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI***

Biyolog Zeynep ÇAĞLAR

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. İnci ARISAN ATAÇ

İSTANBUL, 2005

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i>	3
2.1 Mantarlar	3
2.1.1 Mantarlar Aleminin Genel Özellikleri	4
2.2 Küfler (Küf Mantarları)	5
2.2.1 <i>Trichoderma</i>	6
2.2.1.1 <i>Trichoderma atroviride</i>	7
2.2.2 <i>Trichoderma</i> Türlerinin Uygulama Alanları	10
2.2.2.1 Biyokontrol Ajanı Olarak Patojenlerin Kontrolünde Kullanımları	10
2.2.2.2 Besin ve Tekstil Endüstrisinde Kullanımları	10
3. KİTİN VE TÜREVLERİ	12
3.1 Kitin ve Türevlerinin Kimyasal Yapıları	13
3.2 Kitinin Kristal Yapısı	15
3.3 Kitinin ve Türevlerinin Eldesi	15
3.4 Kitinin Enzimatik Biyosentezi	18
3.5 Kitin ve Türevlerinin Kullanım Alanları	20
3.5.1 Tıpta Kullanım Alanları	20
3.5.1.1 Antitümör Ajan Olarak Kullanımları	20
3.5.1.2 Ortopedik/Periodantal Uygulamalar	20
3.5.1.3 Kitin ve Kitosan Bazlı Sargı Malzemeleri	21
3.5.1.4 Oftalmoloji (Gözbilim)	21
3.5.1.5 Kontrollü İlaç Salınımı	21
3.5.1.6 Antimikrobiyal Ajan Olarak Kullanımı	21
3.5.2 Gıda Endüstrisi Uygulamaları	22
3.5.3 Çevre ve Kirlilik Kontrolü Uygulamaları	22
4. KİTİN YIKIMINDAN SORUMLU ENZİMLER	23
4.1 Kitinazlar	23

4.2	Kitinazların Rolü	24
4.3	Kitinazların Sınıflandırılması	24
4.3.1	Aminoasit Dizilimlerine Dayanarak Kitinazların Sınıflandırılması	25
4.4	Kitinin Enzimatik Hidrolizi	26
4.5	Kitinazların Uygulama Alanları	28
4.5.1	Biyokontrolde Kullanımları	28
4.5.2	Kitooligosakkaritlerin Üretimi	28
4.5.3	Diğer Uygulamalar	28
5.	MATERYAL VE METODLAR	29
5.1	Deneyisel Çalışmada Kullanılan Materyaller	29
5.1.1	Kullanılan Aletler	29
5.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
5.2	Deneyisel Çalışmada Kullanılan Metodlar	31
5.2.1	Protein Miktarının Belirlenmesi	31
5.2.1.1	Total Protein Standart Eğrisinin Çizilmesi	31
5.2.2	Dinitrosalisilik Asit Metodu İle İndirgen Şeker Tayini	32
5.2.2.1	Çözeltilerin Hazırlanması	32
5.2.2.2	N-Asetilglukozamin Standart Eğrisinin Çizilmesi	32
5.2.2.3	Total Ünitenin Hesaplanması	33
5.2.2.4	Spesifik Aktivitenin Hesaplanması	34
5.2.4	Çöktürme Yöntemleri	36
5.2.4.1	TCA ile Çöktürme	36
5.2.4.2	Organik Çözücüler ile Çöktürme	36
5.2.4.3	Amonyum Sülfat Tuzu ile Çöktürme	36
6.	DENEYSEL ÇALIŞMA	38
6.1	Deneyisel Çalışmanın Optimum Koşulları	38
6.2	Mikroorganizma Üretim Ortamı (Katı Besiyeri)	38
6.3	Saf Kültürün Ekilmesi ve Saklama Koşulları	38
6.4	Spor Çözeltilisinin Hazırlanması	38
6.5	Çalışmada Kullanılan Sıvı Kültür Ortamları (Sıvı Besiyerleri)	38
6.5.1	Ön Kültivasyon Ortamı	39
6.5.2	Enzim Üretim Ortamı (Yerdeğiştirme Yöntemi)	39
6.6	Çöktürme Yöntemleri	41
6.6.1	Ham Filtratın Hazırlanması	41
6.6.2	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	41
6.6.3	Organik Çözücülerle Çöktürme	41
6.6.4	Trikloroasetik Asit (TCA) ile Çöktürme	42
7.	SONUÇLAR	43
7.1	Ham Filtrat Protein Miktarı, Total Ünitesi ve Spesifik Aktivitesi	43
7.2	Farklı Konsantrasyonlardaki Amonyum Sülfat Çöktürmesinin Enzim Aktivitesi ve Protein Miktarına Etkisi	45
7.2.1	Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Kitinaz Aktivitesi	45
7.2.2	Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Protein Miktarı	45
7.2.3	Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Spesifik Kitinaz Aktivitesi	45
7.3	Kademeli Amonyum Sülfat Çöktürmesinin Enzim Aktivitesi ve Protein Miktarına Etkisi	49
7.3.1	Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Kitinaz Aktivitesi	49

7.3.2	Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Protein Miktarı	49
7.3.3	Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Spesifik Kitinaz Aktivitesi	49
7.4	Organik Çözücülerle Çöktürme	53
7.4.1	Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Kitinaz Aktivitesi	53
7.4.2	Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Protein Miktarı	53
7.4.3	Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Spesifik Kitinaz Aktivitesi	58
7.5	TCA Çöktürmesi	61
7.5.1	Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Kitinaz Aktivitesi	61
7.5.2	Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Protein Miktarları	61
7.5.3	Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Spesifik Kitinaz Aktivitesi	61
8.	TARTIŞMA	64
	KAYNAKLAR	68
	ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro
K_m	Michaelis sabiti (Enzimin substrata ilgisini yansıtan sabit)

KISALTMA LİSTESİ

BSA	Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
CoA	Koenzim A
CMD	Cornmeal dextrose agar (Mısır dekstroz agar)
DNS	Dinitrosalisilik Asit
exc1	Ekzo-kitinaz 1 geni
exc2	Ekzo-kitinaz 2 geni
GlcN	Glukozamin
GlcNAc	N-asetilglukozamin
GlcNAc-1P	N-asetilglukozamin-1-fosfat
GlcNAc-6P	N-asetilglukozamin-6-fosfat
GlcNAcase	β -N-Asetilglukozaminidaz
GlcNase	Ekzo- β -D-glukozaminidaz
GNA	Glukozamin-6-fosfat N-asetiltransferaz
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology (Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği)
nag1	N-asetilglukozamin 1 geni
PDA	Potato dextrose agar (Patates dekstroz agar)
PPi	Pirofosfat
TCA	Trikloroasetik Asit
UDP	Uridindifosfat
UTP	Uridintrifosfat

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	<i>Trichoderma atroviride</i> kültürü	8
Şekil 2.2	<i>Trichoderma atroviride</i> 'nin şematik olarak morfolojik görüntüsü	8
Şekil 2.3	<i>Trichoderma atroviride</i> 'nin konidleri	9
Şekil 2.4	<i>Trichoderma atroviride</i> hifleri	9
Şekil 3.1	Kitinin kimyasal yapısı	13
Şekil 3.2	Selülozun kimyasal yapısı	14
Şekil 3.3	Kitosanın kimyasal yapısı	14
Şekil 3.4	Kabuk artıklarından kitin, kitosan ve monomer ve oligomerlerinin elde edilmesi	17
Şekil 3.5	Kitinin enzimatik biyosentezi	19
Şekil 4.1	Kitinin enzimatik hidrolizi	27
Şekil 5.1	Total protein standart eğrisi	35
Şekil 5.2	N-asetilglukozamin standart eğrisi	35
Şekil 6.1	Kolloidal kitinin hazırlanması	40
Şekil 7.1.1	Ham filtrat kitinaz aktivitesi	43
Şekil 7.1.2	Ham filtrat protein miktarı	44
Şekil 7.1.3	Ham filtrat spesifik kitinaz aktivitesi	44
Şekil 7.2.1	Farklı amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürmeler sonrası üst sıvılarda saptanan kitinaz aktivitesi	46
Şekil 7.2.2	Farklı amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürmeler sonrası çöktürmelerde saptanan kitinaz aktivitesi	46
Şekil 7.2.3	Farklı amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürmeler sonucu üst sıvılardaki protein miktarları	47
Şekil 7.2.4	Farklı amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürmeler sonucu çöktürmelerdeki protein miktarları	47
Şekil 7.2.5	Farklı amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürmeler sonucu üst sıvıdaki kitinaz enziminin spesifik aktivitesi	48
Şekil 7.2.6	Farklı amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürmeler sonucu çöktürmelerdeki kitinaz enziminin spesifik aktivitesi	48
Şekil 7.3.1	Kademeli amonyum sülfat çöktürmesinin üst sıvıdaki kitinaz aktivitesine etkisi	50
Şekil 7.3.2	Kademeli amonyum sülfat çöktürmesinin çöktürmelerdeki kitinaz aktivitesine etkisi	50
Şekil 7.3.3	Kademeli amonyum sülfat çöktürmesinin üst sıvıdaki protein miktarına etkisi	51
Şekil 7.3.4	Kademeli amonyum sülfat çöktürmesinin çöktürmelerdeki protein miktarına etkisi	51
Şekil 7.3.5	Kademeli amonyum sülfat çöktürmesinin üst sıvıdaki kitinaz enziminin spesifik aktivitesine etkisi	52
Şekil 7.3.6	Kademeli amonyum sülfat çöktürmesinin çöktürmelerdeki kitinaz enziminin spesifik aktivitesine etkisi	52
Şekil 7.4.1	İki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol çöktürmesinin üst sıvıdaki kitinaz aktivitesine etkisi	54
Şekil 7.4.2	İki farklı konsantrasyonda uygulanan aseton çöktürmesinin üst sıvıdaki kitinaz aktivitesine etkisi	54
Şekil 7.4.3	İki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol çöktürmesinin çöktürmelerdeki kitinaz aktivitesine etkisi	55
Şekil 7.4.4	İki farklı konsantrasyonda uygulanan aseton çöktürmesinin çöktürmelerdeki kitinaz aktivitesine etkisi	55

Şekil 7.4.5	İki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol çöktürmesinin üst sıvıdaki protein miktarına etkisi.....	56
Şekil 7.4.6	İki farklı konsantrasyonda uygulanan aseton çöktürmesinin üst sıvıdaki protein miktarına etkisi.....	56
Şekil 7.4.7	İki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol çöktürmesinin çökeltideki protein miktarına etkisi.....	57
Şekil 7.4.8	İki farklı konsantrasyonda uygulanan aseton çöktürmesinin çökeltideki protein miktarına etkisi.....	57
Şekil 7.4.9	İki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol çöktürmesinin üst sıvıdaki kitinaz enziminin spesifik aktivitesine etkisi.....	59
Şekil 7.4.10	İki farklı konsantrasyonda uygulanan aseton çöktürmesinin üst sıvıdaki kitinaz enziminin spesifik aktivitesine etkisi.....	59
Şekil 7.4.11	İki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol çöktürmesinin çökeltideki kitinaz enziminin spesifik aktivitesine etkisi.....	60
Şekil 7.4.12	İki farklı konsantrasyonda uygulanan aseton çöktürmesinin çökeltideki kitinaz enziminin spesifik aktivitesine etkisi.....	60
Şekil 7.5.1	İki farklı konsantrasyonda uygulanan TCA çöktürmesinin çökeltideki kitinaz aktivitesine etkisi	62
Şekil 7.5.2	İki farklı konsantrasyonda uygulanan TCA çöktürmesinin çökeltideki protein miktarına etkisi.....	62
Şekil 7.5.3	İki farklı konsantrasyonda uygulanan TCA çöktürmesinin çökeltideki spesifik kitinaz aktivitesine etkisi.....	63

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1	Mantarların sınıflandırılması ve temel özellikleri	3
Çizelge 5.1	Kullanılan kimyasal maddeler	30

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince ve daha da önemlisi Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladığım ilk andan itibaren her türlü desteğini ve yardımını benden esirgemeyen, önerileriyle bana yol gösteren, en zor anlarımda sıcacık bir anne şefkatiyle ve gülümsemesiyle bana güç veren çok değerli hocam Sayın Doç.Dr. İnci ARISAN ATAÇ'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Deneysel çalışmam süresince bilgi ve yenilikçi fikirleri ile bana yol gösteren, çalışmamı yönlendiren, her an ilgi ve yardımını benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Ayşegül PEKSEL'e,

Laboratuar çalışmalarımı zevkli kılan arkadaşlarım Nurdagül ORHAN, Nilay ALTAŞ ve Neşe ATACI'ya,

Manevi desteği ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan Arş.Gör. Mustafa Kemal GÜMÜŞ'e,

Ayrıca Yıldız Teknik Üniversitesi ile tanışmamı sağlayan ve manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sabiha MANAV YALÇIN'a,

Eğitim ve öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yanımda olduklarını bildiğim sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Kitinazlar [E.C.3.2.1.14], β -1,4-bağlı N-asetil-D-glukozaminin doğrusal bir homopolimeri olan kitini hidroliz eden enzimlerdir. Kitin birçok alg ve mantarın hücre duvarlarının böceklerin ve eklembacaklıların dış iskeletlerinin, deniz omurgasızlarının kabuklarının, temel bileşenidir.

Kitin ve kitinolitik enzimler biyoteknolojik uygulamalar için büyük bir öneme sahiptir. Özellikle, kitinazlar bitki patojenlerini kontrol amaçlı tarımda kullanılırlar. Kitinazlar ve kitinin enzimatik hidrolizi ile oluşan kitooligomerler aynı zamanda insan sağlığının korunmasında kullanılabilirler. Farklı açılardan kitinazların kullanımındaki başarı makul maliyette yüksek aktiviteli preparasyonların elde edilmesine bağlıdır. Bu nedenle, kitinolitik enzimlerin genetik ve biyokimyasının, filogenetik akrabalıklarının ve değerlendirme metotlarının anlaşılması, bu enzimleri yakın gelecekte çeşitli proseslerde kullanılabilir kılacaktır.

Kitinin yıkımı ve kitinazlar, biyolojik ve biyoteknolojik proseslerin geniş bir kısmında önemli bir yere sahiptir. Kitin artıklarının çevresel temizliğinden, insan hastalıklarının tedavisine, bitki savunma sistemlerine ve biyolojik kontrole kadar uzanan birçok alanda öneme sahiptirler. Bu nedenlerle bitki biyokontrolünde sıkça kullanılan bir küf mantarı olan *Trichoderma atroviride*'nin ürettiği kitinaz enzimi incelendi. Patates-dekstrozu agar üzerinde yetiştirilen *T. atroviride*'den kitinaz indüksiyonu, Dana ve arkadaşlarının önerdiği sıvı besiyerinde sağlandı. *T. atroviride*'nin yer değiştirme yöntemi kullanılarak, %0.1 kolloidal kitin içeren sıvı besiyerinde, 30 °C'de 48 saat boyunca çalkalamalı inkübasyonu sonucu maksimum kitinaz aktivitesi elde edildi. Kitinaz enzimine amonyum sülfat tuzu, etanol, aseton ve trikloroasetik asit gibi farklı çöktürme yöntemlerinin etkisi incelendi.

Anahtar kelimeler: Kitinaz, *Trichoderma atroviride*, enzim aktivitesi, saflaştırma.

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 a major component of most fungal and algae cell walls, insects and arthropods exoskeletons, and shells of marine invertebrates.

Chitin and chitinolytic enzymes are gaining importance for their biotechnological applications. Particularly, chitinases are used in agriculture to control plant pathogens. Chitinases and chitooligomers produced by enzymatic hydrolysis of highly active preparations at reasonable cost. Therefore, the understanding of biochemistry and genetics of chitinolytic enzymes, their phylogenetic relationships and methods of estimation will make them more useful in a variety of processes in near future.

Chitin degradation and chitinases are important in a wide variety of biological and biotechnological processes, ranging from the exploitation and environmental clean-up of chitinous wastes, to human therapy, plant defense systems and biological control. For this reason, being a mold, frequently used in plant biocontrol *Trichoderma atroviride* producing chitinase was examined. *T. atroviride* culture was maintained on potato-dextrose agar. Chitinase induction was carried out on liquid medium which had been proposed by Dana et al. It was determined that the maximum chitinase activity obtained with *T. atroviride* when the liquid medium which was contained 0.1% colloidal chitin, the method of replacement was applied, and the cultivation was carried out at 30 °C for 48 hours with rotary shaker. Then, ammonium sulfate, ethanol, acetone and trichloroacetic acid were examined upon the chitinase activity.

Keywords: Chitinase, *Trichoderma atroviride*, enzyme activity, purification.

1. GİRİŞ

Trichoderma atroviride (ATCC 74058) soyu *Trichoderma harzianum* P1 olarak da bilinen toprak kökenli, filamentli bir mantardır. *Trichoderma* türlerinin bitkiler için patojen olan mantarların kontrolündeki yetenekleri uzun zamandan beri bilinmektedir. Fakat biyokontrol amaçlı kullanılan türlerin uygulamadaki başarısının önceden tahmin edilmesi kolay değildir. Bunun yanı sıra mikoparazitliğin ve düzenlenmesinin tanımlanması gibi biyokimyasal olayların anlaşılması, bir biyokontrol ajanı olarak *Trichoderma* türleri üzerindeki güvenilirliğin artırılması için stratejiler doğurmaktadır. Biyokontrolde kullanılan ve daha sıkça çalışılan türler, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* ve *Trichoderma asperellum*'dur (Kubicek ve Harman, 1998).

Kitin, N-asetil-D-glukozaminin β -1,4 bağlı, yüksek molekül ağırlıklı, çözünmez, lineer bir homopolimeridir. Doğada selülozdan sonra en çok bulunan polisakkarit olarak bilinir. Mantarların ve alglerin hücre duvarlarının, böceklerin ve eklembacaklıların dış iskeletlerinin molluskların ve deniz omurgasızlarının kabuklarının temel yapısal bileşenidir (Muzzarelli,1977; Gooday and Trinci,1980; Flach, 1992; Deshpande,1999; Tanaka vd., 2003).

Kitinin tam olarak enzimatik hidrolizi sonucu birbirinden bağımsız N-asetilglukozamin (GlcNAc) birimleri oluşur. Bu hidroliz kitinolitik bir sistem tarafından gerçekleştirilir (Deshpande,1986; Gooday vd.,1985; Shaikh,1993). Kitinolitik enzimlerden biri olan kitinazların [E.C.3.2.1.14] bakteriler, virüsler, yüksek organizasyonlu bitkiler, hayvanlar ve insanlar gibi kitin içermeyen organizmaların yanı sıra mantarlar, böcekler, eklembacaklılar ve kabuklu deniz omurgasızları gibi çeşitli organizmalarda bulunduğu saptanmıştır (Jolles, 1984; Muzzarelli, 1999).

Bakterilerde kitinazlar, beslenmeleri ve mantar, protozoa ve omurgasızlar gibi konukçularda parazit olarak yaşayabilmeleri açısından önemli rol oynar. Kitinazlar, bitki ve omurgalıların savunma mekanizmalarında da görevlidir. Böcek zararlılarının biyolojik kontrolünde kullanılan baculovirüsler de patojenlere karşı kitinaz üretirler (Gooday, 1995). İnsan serumunda da kitinaz aktivitesi tanımlanmıştır. Bunun muhtemelen fungal patojenlere karşı savunmada rolü olduğu önerilmektedir (Escott vd., 1996 ve Aerts vd., 1996). Böceklerde kitinazlar tüy dökme ve kabuk değiştirme dönemlerinde etkindir. Birçok sölenler, nematod, mollusk ve eklembacaklıların sindirim sisteminin farklı doku bezlerinden de kitinazlar sentezlenir. Omurgalı hayvanlar ile böcek yiyen kuşların ve memelilerin mide mukozası ve pankreasında da salgılanır. Tüm bu kitinazların fizikokimyasal özellikleri ve enzimatik

reaksiyon mekanizmaları birbirlerinden farklıdır (Wu vd., 2001).

Filamentli mantarlar tarafından üretilen kitinazlar, büyüme ve morfogenez açısından mikroorganizmalar için önemli bir role sahiptir. Hif oluşumu için hücre duvarının bölgesel zayıflatılması, spor germinasyonu sırasında germ tüpünün oluşturulması, hücre duvarı sentezi ve yıkımı arasındaki dengenin ve duvar esnekliğinin belirlenmesi, hif uzaması ve otolizi, sporların farklılaşması gibi birçok yaşamsal olayda kitinazların rolü büyüktür (Gooday vd., 1992).

Kitinolitik enzimler; bitki patojeni olan mantar ve böceklerin biyokontrolünde, gıda ve yem endüstrisinde, insan sağlığı ve ilaç endüstrinde, tek hücre proteini üretiminde ve özellikle kitin bakımından zengin atık materyallerin parçalanmasında önemli bir role sahiptirler (Patil vd., 2000).

Trichoderma türlerinden klonlanan ve bitki hastalıklarına direnç sağlayan birkaç gen, bitkilere özellikle ekin bitkilerine transgenik olarak sokulmuştur. Benzer genler henüz ticari olarak mevcut değildir fakat sayısız gelişme vardır. *Trichoderma* türlerinin sahip olduğu bu genler doğal organik ekin koruması ve üretimi için temel oluşturmaktadır.

Çalışmalarımızda fungal patojenlerin biyokontrolü için *Trichoderma* türleri tarafından üretilen enzimlerden ya da bu enzimleri kodlayan genlerden yararlanarak daha etkin tekniklerle yeni prosesler geliştirmek amaçlanmaktadır. Bu nedenle hedeflenen çalışmada, kitinaz enziminin saf halde uygulandığında biyokontroldeki başarısının daha fazla olacağı düşünülerek saflaştırılması amaçlanmıştır. Kitinaz enzimi kaynağı olarak *Trichoderma atroviride* seçilmiştir.

2. *TRICHODERMA ATROVİRİDE*

2.1 Mantarlar

Tüm mantarlar organotroptur yani organik maddelerle beslenirler. Klorofil içermezler dolayısıyla fotosentez yapamazlar. Morfolojik özellikleri ve yaşam çevrimleri açısından geniş bir çeşitlilik gösterirler ve bu özelliklerine dayanarak sınıflandırılırlar. (Brock ve Madigan, 1991).

Çizelge 2.1 Mantarların sınıflandırılması ve temel özellikleri

Grup	Yaygın Kullanılan Adı	Hifler	Tipik Temsilcileri	Seksüel Sporların Tipleri	Habitatları
Ascomycetes	Keseli mantarlar	Bölünmüş	<i>Neurospora</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Morchella</i> (yenilebilir mantarlar)	Askospor	Toprak, çürümüş bitkiler
Basidiomycetes	Saplı mantarlar, yenilebilir mantarlar	Bölünmüş	<i>Amanita</i> (zehirli mantarlar), <i>Agaricus</i> (yenilebilir mantarlar)	Basidiyospor	Toprak, çürümüş bitkiler
Zygomycetes	Ekmek küfleri	Çok nukleuslu ve bölünmemiş	<i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> (yaygın ekmek küfleri)	Zigospor	Toprak, çürümüş bitkiler
Oomycetes	Su küfleri	Çok nukleuslu ve bölünmemiş	<i>Allomyces</i>	Oospor	Sular
Deuteromycetes	Küf mantarları	Bölünmüş	<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Trichoderma</i>	Seksüel spor yok (sporlar aseksüeldir)	Toprak, çürümüş bitkiler, hayvanların vücut yüzeyleri

Mantarlar ökaryotların geniş bir grubunu oluştururlar. Fungi yani mantarlar alemi, yenilebilir mantarları kapsadığı gibi, bir çok mikroskobik küf ve mayaları da içine alır. Mantar hücreleri

nukleus, vakuol ve mitokondri içeren tipik ökaryotik hücrelerdir (Brock ve Madigan, 1991).

Mantarlar alemi, son 10 yılda çeşitli taksaların düzenlenmesi ile oldukça büyük değişimlere maruz kalmıştır. Özellikle ribozomal RNA ve DNA gibi biyokimyasal özelliklerin karşılaştırılması için geliştirilen teknikler doğru sınıflandırma için gerekli olan ve gün geçtikçe artan bilgiler sağlamaktadır (Hawksworth, 1991; Hawksworth vd., 1995).

Mantarlar dünya üzerinde tüm çevrede bulunmaktadır ve önemli ayrıştırıcıları (çürükçülleri) ve parazitleri kapsarlar. Parazit mantarların bir grubu kuşlar, böcekler, insanlar ve diğer memeliler dahil olmak üzere hayvanları enfekte ederek kaşıntıdan ölüme kadar farklı sonuçlar doğururlar. Diğer parazit mantarlar ise bitkileri enfekte eder ve ağaçların da dahil olduğu yüksek organizasyonlu bitkilerin yıkılıp devrilmesi gibi sonuçlar doğuran sap çürümesi benzeri hastalıklara sebep olurlar. Damarlı bitkilerin büyük çoğunluğu *mycorrhizae* diye adlandırılan mutualist mantarlarla ilişki içindedirler. Bu mutualist mantarlar, bitkilere köklerinden besin ve su adsorbsiyonu için yardım ederler. Bazı mantarlar ise besin olarak kullanılırlar, diğerleri ise aşırı derecede zehirlidir [1].

2.1.1 Mantarlar Aleminin Genel Özellikleri

Mantarlar hücre duvarlarına sahiptirler. Hücre duvarları kitin, kitosan, glukan gibi maddelerden yapılır. Tallus olarak adlandırılan vejetatif bir vücuda sahiptirler. Tallus hif denilen bir hücreli kalın filamentlerden oluşmaktadır. Besin kaynağı üzerinde hifler, misel olarak adlandırılan mikroskobik bir ağ oluşturur. Besinler misel içinde absorblanır. Genellikle bir mantarın en dikkat çeken kısmı üreyebilme yeteneğindeki yapılarıdır. Bu yapılar sporları meydana getirirler [1].

Hiflerin hücrelere bölünmesi septum denilen duvarlarla gerçekleşir ve bu durumda hücrelere bölünmüş hifler septat olarak adlandırılabilir. Hücre bölünmesi görülmeyen hifler ise koenositik olarak adlandırılırlar ve birden fazla nukleus içerirler. Bazı mantarlar ise misel yapıdan tek hücreli yapıya geri başkalaşım gösterirler, mayalar bu gruba girer. (Brock ve Madigan, 1991) [1].

Mantarlar klorofilsiz, parazit veya saprofit yaşayan heterotrof organizmalardır. Genellikle renksizdirler fakat bazı yüksek organizasyonlu mantarların şapka şeklindeki yapılarında (fruktifikasyonlarında) renk maddesi bulunur (Tutel ve Çırpıcı, 1999).

Mantarlar kendi enerjilerini organik molekülleri parçalayarak elde ederler. Fakat bitkiler gibi inorganik maddelerden organik maddeler sentezleyemezler. Çevrelerindeki substratlara etki

eden ekzozimimleri salgılayarak beslenirler. Ekzozimimler hayvanlardaki sindirim enzimleri ile benzerdir, büyük organik molekülleri parçalarlar fakat organizma dışında fonksiyon gösterirler. Daha sonra küçük organik moleküller mantar hücreleri tarafından absorblanır [1].

Mantarların üremeleri hem eşemli hem eşemsizdir. Eşemsiz üreme daha yaygındır. Mantarlar tatlı suda, karada ve ender olarak denizde yaşarlar. Parazit olan ve hastalık meydana getiren mantarların yanı sıra faydalı olanları da vardır; örneğin antibiyotik ve drog (bitkisel kaynaklı hammadde) elde edilen mantarların sayısı son yıllarda gittikçe artmaktadır. Bazı mantarlar da alkol fermentasyonu yaptıklarından ötürü içki, meyve suları ve özel vitaminli ekmek yapımında kullanılırlar (Tutel ve Çırpıcı, 1999).

2.2 Küfler (Küf Mantarları)

Küfler, mantarlar alemi içinde yer alan mikroskopik ve filamentli mantarlardır. Doğada yaygın olarak bulunurlar. Özellikle bayat ekmek, peynir ya da meyve üzerinde görülürler. Tek bir filament hif olarak adlandırılır. Hifler genellikle birlikte, çapraz bir gelişim gösterir ve yoğun kümeler oluşturur. Tüm bu yapıya misel denir. Misel mikroskop olmadan kolaylıkla gözle görülebilir. Misel tek bir hifin dallanıp gelişmesi ile ortaya çıkar. Hif dallanmaları iç içe gelişerek, arapsaçı halini alan yoğun bir tabaka oluştururlar. Çoğu kez bir mantar hifinin vejetatif hücresi birden fazla nukleus içerir. Bu durumda tipik bir hif yapısı ortaya çıkar. Koenositik olarak adlandırılan bu hif yapısı çapraz duvarlarla bölünmemiş tek bir hücreden meydana gelir ve sitoplazma içinde yüzlerce nukleus bulunur. Koenositik hiflerde etkin bir sitoplazmik hareket oluşur. Diğer bir hif yapısı ise septum denilen çapraz duvarlarla bölünmüş, birden fazla hücre görünümündedir. Her ne kadar tamamiyle bölünmüş hücreler gibi görünseler de septumların merkezinde bir por bulunur. Bu por daha az etkin olan bir sitoplazmik hareket sağlar (Brock ve Madigan, 1991).

Misel içinden yüzeye doğru uzanan ve hava ile temas eden hif dalları farklılaşarak konid adı verilen sporları meydana getirir. Konidler aseksüel (eşesiz) sporlardır. Yüksek oranda pigment içerirler, kuraklığa ve zor hava koşullarına dayanıklıdırlar. Mantarların yeni habitatlara yayılması konid adı verilen bu sporların temel fonksiyonudur. Konidler meydana geldiği zaman, beyaz renkli misel konidlerin taşıdığı pigmentler ile ilişkili olarak renk değiştirir. Yani misellerin siyah, kahverengi, kırmızı, ya da mavi-yeşil renkli gözükmelerinin sebebi meydana getirdikleri sporlardır. Bu sporların varlığı keçe benzeri bir yapıda olan misele toz gibi bir görüntü kazandırır. Konidlerin oluşumları eşemli üreme ile gerçekleşmez; bu nedenle konidler eşesiz sporlardır. Sayıları çok fazla olan bu sporlar havaya kolaylıkla

yayılır bu nedenle küfler sıkça rastlanan laboratuvar kontaminantlarıdır. Aynı zamanda hava ile taşınan bu küf sporları alerjik reaksiyonlardan da sorumlu olabilmektedirler (Brock ve Madigan, 1991).

Bazı küflerse eşemli üremenin bir sonucu olarak seksüel (eşeyli) spor üretirler. Eşemli sporlar tek hücreli gametlerin birleşmesi ile ya da gametang olarak adlandırılan özelleşmiş hiflerin birleşmesi ile meydana gelirler. Eşemli sporlar, iki haploid hücrenin birleşmesi ile oluşan diploid hücrelerin daha sonra mayoz ve mitoz geçirmesi ile oluşurlar. Farklı mantar gruplarına bağlı olarak farklı tipte eşemli sporlar üretilir. Örneğin; kapalı bir kese (askus) içinde gelişen sporlara askospor, bu keseler bir sapın (bazid) ucunda meydana geliyorsa üretilen sporlara bazidyospor adı verilir. Mantarlara ait bu eşemli sporlar kuraklığa, sıcaklığa, donmaya ve bazı kimyasal ajanlara karşı dirençlidirler. İster eşemli ister eşemsiz olsun sporlar yeni bir hif oluşmasından ve dolayısıyla yeni bir miselin gelişmesinden sorumlu yapılardır (Brock ve Madigan, 1991).

Küflerin üredikleri ortama proteaz, lipaz, karbonanhidrazlar, kitinaz gibi litik enzimleri salgılamaları ve küflerin ürettikleri çeşitli metabolitlerin birçok alanda kullanılabilir olması bu organizmaların endüstrideki önemini oldukça arttırmaktadır (Topal-Sarıkaya, 2002).

Küflerin ürettiği endüstriyel ürünlerden bazıları:

- Antibiyotikler
- Sitrik asit
- Çeşitli peynirler (Rokfor peyniri vb.)
- Sake (Japon içkisi)
- Soya fasülyesi sosu ve diğer bazı soslar
- Çeşitli enzimler (amilaz, glukoamilaz, selülaz, pektinaz, proteaz, kitinaz vb.)

2.2.1 *Trichoderma*

Trichoderma hemen hepsi karada yaşayan mantar sınıfı olan *deuteromycetes*'e ait bir cinstir. *Trichoderma* türleri, orman humus tabakası, tarım toprakları ve üzerinde meyve ağacı yetişen topraklar dahil olmak üzere tüm topraklardaki mikrofloranın baskın bir bileşenidir (Roiger vd., 1991).

Trichoderma türleri hemen hemen tüm topraklarda ve çeşitli habitatlarda bulunan küf

mantarlarıdır. Topraklardan izole edilerek kültürü yapılabilir. Yüksek bitkilerin köklerine tutunarak hızla çoğalırlar. Bazı türler bitki kök hücrelerinin içine girebilme ve köklerde koloni oluşturabilme yeteneğindedirler. Ayrıca *Trichoderma* türleri, diğer mantarlara karşı saldırgan ve parazittirler; başka bir deyişle besinlerini diğer mantarlardan elde ederler [2].

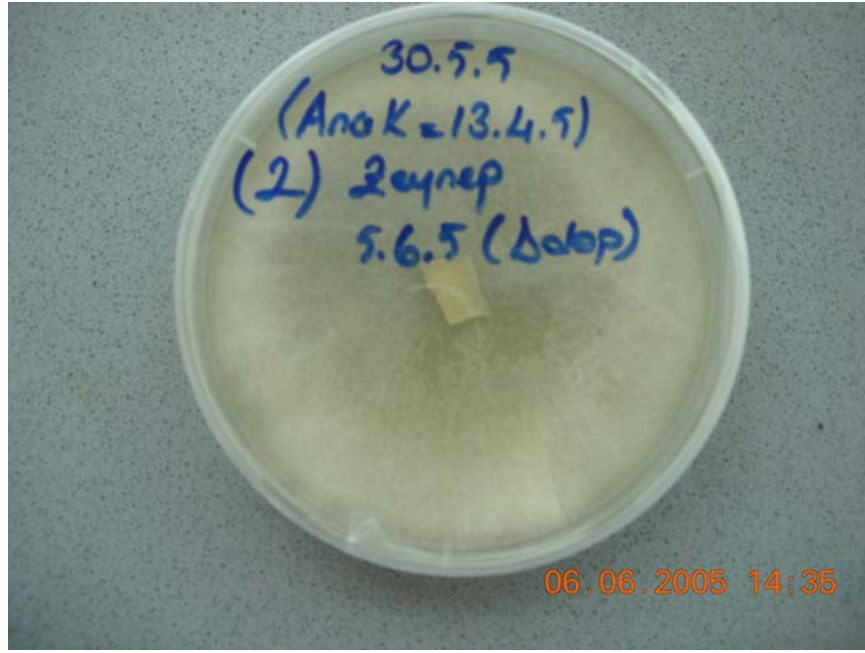
Trichoderma türleri tipik mantar hifleri şeklinde gelişir ve dallanırlar. Hifler 5-10 µm çapındadır. Hücre duvarı kitindendir. Eşemsiz üreme konidler ile gerçekleşir (Tutel ve Çırpıcı, 1999). Çoğu *Trichoderma* türü seksüel evreye sahip değildir fakat aseksüel sporlar üretirler. Genellikle yeşil renkli konidler 3-5 µm çapındadır. Bununla birlikte birkaç tür için seksüel evre bilinmektedir, fakat bu türler biyokontrol amaçlı kullanılmaz. Ticari olarak tarımda kullanılan biyokontrol türleri homokaryotik yani nukleusların tümü genetik olarak benzer ve tek tip olmalıdır (Kubicek ve Harman, 1998).

Trichoderma kültürleri tipik olarak 25-30 °C’de hızlı gelişim gösterirken, 35 °C’de gelişim göstermezler. Koloni miselleri ilk aşamada mısır-dekstroz agar (CMD) besiyeri üzerinde şeffaf, daha zengin içerikli patates-dekstroz agar (PDA) besiyeri üzerinde ise beyaz renklidirler. Besiyeri üzerinde gelişen miseller bir hafta içinde oluşan konidler (sporlar) sayesinde sarı, yeşil ve daha nadir olarak beyaz gölgeli bir görünüm kazanır. Özellikler PDA besiyeri üzerinde yetiştirilen kültürlerin konidlerindeki sarı pigment agar içine salınabilir. Bazı türler ise karakteristik bir şeker ya da hindistan cevizi kokusu oluşturur. Çoğu türde konidler elips benzeri bir şekildedir, küresel konidler nadir olarak bulunur. Konidlerin yüzeyi pürüzsüzdür fakat urlu ya da yumrulu konidler birkaç türde bulunmaktadır [3].

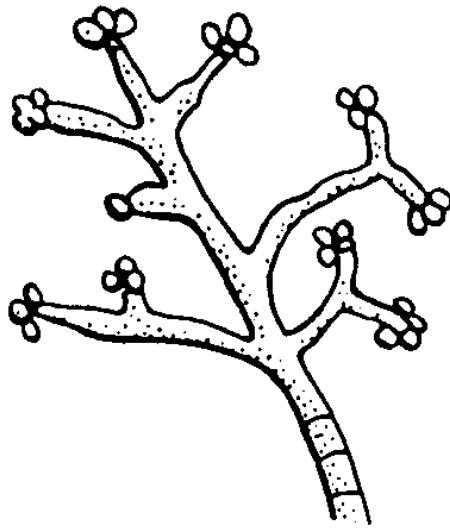
2.2.1.1 *Trichoderma atroviride*

Trichoderma atroviride (ATCC 74058) soyu *Trichoderma harzianum* P1 olarak da bilinen toprak kökenli, filamentli bir mantardır. Birkaç bitki patojeni mantarın etkili biyokontrol ajanıdır. Birçok kimyasal fungusite karşı yüksek direnç gösterir (Mach vd., 1999; Paulitz ve Belanger, 2001).

En iyi ve en çok çalışılmış kitinolitik sistemler *Trichoderma* türleri arasındaki *T. harzianum* ve *T. atroviride*’dekilerdir. Hepsi glukozil hidrolazların 18. ailesine ait olan 42 kDa’luk, 33 kDa’luk ile 36 kDa’luk endokitinazları kodlayan genleri klonlanmıştır (Hayes vd., 1994; Carsolio vd., 1994; Garcia vd., 1994.; Limon vd., 1995; Viterbo vd., 2001). 20. aileye ait N-asetil-β-D-glukozaminidazlardan *exc1* ve *exc2* ile *nag1* genleri de klonlanmıştır (Draborg, vd., 1995; Peterbauer vd., 1996).



Şekil 2.1 *Trichoderma atroviride* kültürü



Şekil 2.2 *Trichoderma atroviride*'nin şematik olarak morfolojik görüntüsü [5]

Trichoderma atroviride, *Trichoderma* cinsinin tipik bir örneğidir. Hif yapısı koenositiktir yani hücrelere bölünmemiş ve çok nukleusludur. Hif dallanması ana eksene yaklaşık 90 ° açılı ile gerçekleşir. Konid olarak adlandırılan eşeimsiz sporları, elips şeklinde (3,5 x 2-4 µm çapında) kuru görümlü ve pürüzsüzdür [3]. Gelişmesi için gerekli optimum sıcaklık 30 °C'dir fakat 0 °C civarındaki sıcaklıklarda da türlerin etkin olduğu bulunmuştur (Tronsmo, 1989). PDA üzerinde gelişen miseller sporların oluşması ile sarı veya yeşil nadiren de beyaz renkli görünürler [3].



Şekil 2.3 *Trichoderma atroviride*'nin konidleri [4]



Şekil 2.4 *Trichoderma atroviride* hifleri [4]

2.2.2 *Trichoderma* Türlerinin Uygulama Alanları

Trichoderma türleri ticari olarak başta biyolojik kontrol, tekstil ve besin endüstrileri olmak üzere çeşitli amaçlarla birçok alanda kullanılmaktadır.

2.2.2.1 Biyokontrol Ajanı Olarak Patojenlerin Kontrolünde Kullanımları

Trichoderma türleri biyolojik kontrolde başarılıdırlar. Çünkü parazit patojen mantarlara karşı çeşitli yeteneklere sahiptirler. Örneğin; beslenmeleri için patojenik mantarlar ile dış-rekabetçi olarak yarışır, patojenler için toksik olan bileşikler üretirler ya da ürettikleri enzimler patojenik mantarların hücre duvarlarını parçalar. Bu yetenekleri ile bitkilere, saldırılara karşı başarılı bir savunma imkanı sağlayarak, bitki gelişimi ve direncini arttırabilirler (Harman ve Kubicek, 1998).

Her patojenik mantarın kontrolü *Trichoderma*'nın farklı türleri ve soyları ile yapılır. Çoğu *Trichoderma* türü patojenlerin kontrolü için diğer mantarlardan daha fazla etkindir. Son bulgular, bazı *Trichoderma* türlerinin bitkilerin doğal savunma mekanizmalarını arttırdığı yolundadır. Bununla birlikte *Trichoderma* türleri birçok tarım kimyasalına karşı kalıtsal bir dirence sahiptir, bu kimyasallar içine fungusitler de dahildir [2].

Yıllardır, *Trichoderma* türlerinin bitki büyümesi ve gelişimini arttırdığı özellikle daha güçlü köklerin oluşmasına sebep oldukları bilinmektedir (Harman ve Kubicek, 1998). Son araştırmalarda, bir *Trichoderma* soyunun, hemen hemen bir metre uzunluğundaki derin köklerin sayısını arttırdığı ve bu derin kökler sayesinde bitkilerin kuraklığa daha dirençli olduğu bulunmuştur. *Trichoderma* T-22 soyu ile bulaştırılmış mısır kökleri, bu mantarların olmadığı mısır kökleri ile kıyaslandığında, %40 daha az azot içeren gübrede gelişim göstermişlerdir (Altomare vd., 1999; Harman, 2000).

Tanımlanmış biyokontrol mikroorganizmaları bitkilerde biyokontrolü sağlayan ürünleri kodlayan çok sayıda geni içeriyor olmalıdır (Harman ve Kubicek, 1998). Tütün ve patates bitkilerine transgenik olarak sokulan endokitinaz genleri, tütün bitkisinde *Alternaria alternata*'ya ve patates bitkisinde *Rhizoctonia solani*'ye karşı yüksek direnç gösteren bitkilerin gelişmesini sağlamıştır (Lorito vd., 1998).

2.2.2.2 Besin ve Tekstil Endüstrisinde Kullanımları

Trichoderma türleri birçok ekstraselüler (hücre dışına salgılanan) enzimin üreticileridir. Kompleks polisakkaritlerin yıkımından sorumlu olan selülaz, kitinaz ve diğer enzimlerin ticari olarak üretimi için kullanılırlar. Bu amaçlarla besin ve tekstil endüstrilerinde sıkça

kullanılırlar. Örneğin, bu mantarlardan elde edilen selülozlar, kot kumaşlarının yumuşatılması ve beyazlaştırılmasında biyolojik taşıma amaçlı kullanılırlar. Ayrıca bu enzimler kümes hayvanlarının beslenmesinde arpa ve diğer ekinlerin hemiselülozlarının sindirilebilirliğini arttırmak için kullanılırlar (Harman ve Kubicek, 1998).

3. KİTİN VE TÜREVLERİ

Kitin terimi Yunanca'dan kökenlenmiş ve katı, sert örtü anlamına gelmektedir [1]. Sistematik adı (1,4)-2 asetamid-2-deoksi- β -D-glukan olan kitin, β (1,4) bağlı N-asetil glukozamin birimlerinden oluşan doğrusal bir polisakkarittir ve doğada selülozdan sonra en bol bulunan ikinci biyopolimerdir (Deshpande, 1986; Chen ve Chang, 1994; Muzzarelli ve Muzzarelli, 1998; Tanaka vd. 2003).

Mantarların hücre duvarları, böceklerin ve diğer artropodların dış iskeletleri, krustase kabuklarının temel yapısal bileşenidir (Gooday vd., 1980; Deshpande, 1986; Flach vd., 1992; Cauchie, 2002; Merzendorfer, 2003; Adams, 2004; Hoell vd., 2005). Kitin; nematodlar (yuvarlak kurtlar), karides, yengeç, ıstakoz gibi krustaseler, gelinböceği, kelebek, sivrisinek gibi artropodlar, midye, istiridye, salyangoz gibi mollusklar dahil olmak üzere maya, mantar, alg gibi daha bir çok organizmada yaşamsal öneme sahip bir polisakkarittir (Gooday ve Trinci, 1980; Kramer ve Koga, 1986; No vd., 1989, Cabib vd., 1989; Cho vd., 1998; Kumar, 2000; Cauchie, 2002; Merzendorfer ve Zimoch, 2003; Adams, 2004). Aynı zamanda kitin böceklerin üst derilerinde, trake borularında ve kaslarında protein ve diğer komponentlerle birlikte bulunur (Kramer ve Koga, 1986).

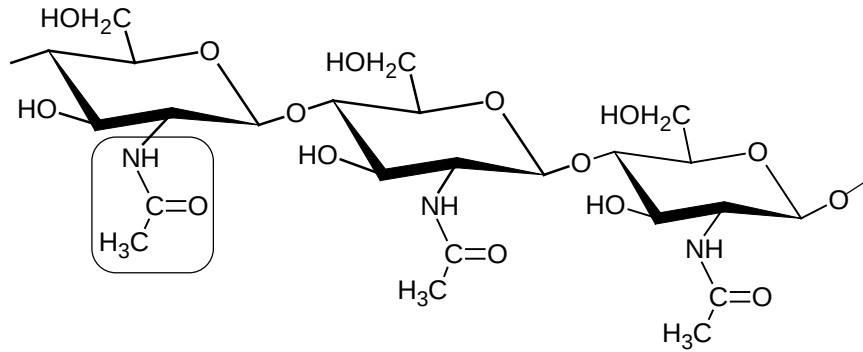
Kitin; beyaz, sert, elastik olmayan, azotlu bir polisakkarittir ve sahil kesimlerinde yüzey kirliliğinin başlıca sebebidir (Kumar, 2000). Dünya yüzeyinde kabuklu hayvanların, yengeçlerin, ıstakozların, krillerin işlenmesinden oluşan katı atıklar kitinsel atıkların büyük bir miktarını oluşturur (Roy vd., 2003). Suda yaşayan ve karaya vuran ürünlerin neredeyse %10'u kitinden zengin organizmalardan meydana gelmektedir. Bu payı oluşturan organizmaların başlıcaları karides, yengeç, kalamar, istiridye ve mürekkepbalığıdır. Bir yılda tüm dünya üzerinde deniz atıklarından elde edilen kitinin 80 000 tondan daha fazla olduğu belirlenmiştir (Subasinghe, 1995; Muzzarelli, 1977).

Mantarların hücre duvarlarının %22 - %44'ü kitinden oluşmaktadır. Mantar atıklarından elde edilen kitin, deniz kaynakları ile kıyaslandığında önemsenmeyecek kadar az miktardadır (Muzzarelli, 1977; Patil vd., 2000). Fakat kitin ve kitosanın geniş kullanım alanları nedeniyle mantarların ticari olarak üretimleri yapılmaktadır (Muzzarelli vd., 1994).

Kitosan; kitinin deasetillenmiş formudur. Kitin dallanmamış zincir polimeri yapısındadır ve β -1,4 bağlı N-asetilglukozamin (GlcNAc) birimlerinden oluşurken, kitosan da glukozamin birimlerinden meydana gelmektedir (Muzzarelli vd., 1994; Deshpande, 1986).

3.1 Kitin ve Türevlerinin Kimyasal Yapıları

Kitin, N-asetil-D-glukozamin (2-asetil-2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoz) birimlerinin β -D (1,4) bağları ile bağlanmasından oluşmuş, yüksek molekül ağırlıklı doğrusal bir homopolimeridir (Muzzarelli, 1977; Revahmoiseev ve Carroad, 1981; Tom ve Carroad, 1981; Limon, 2001).

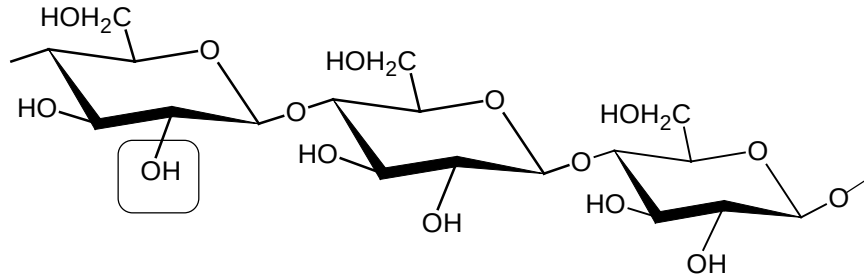


Şekil 3.1 Kitinin kimyasal yapısı

Kitin birkaç milyon daltonluk büyük bir molekül ağırlığına sahip, uzun zincirli bir moleküldür. Kitinin molekül yapısı Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Kitin ve kitosan oligomerlerinin fonksiyonel özellikleri ve fizyolojik aktivitelerinin çoğu onların molekül ağırlıklarına ve zincir uzunluklarına bağlıdır (Shahidi vd., 1999).

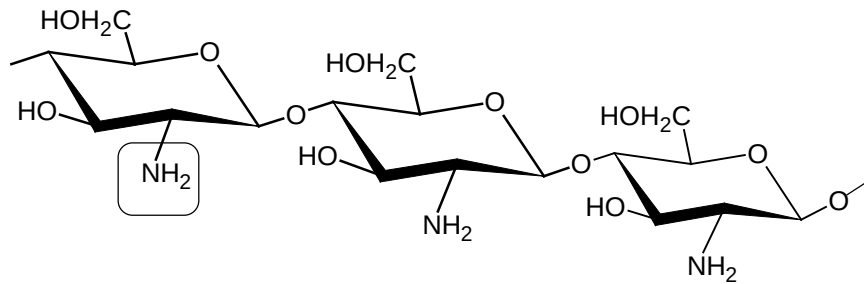
Doğal polisakkaritlerin çoğu nötr ya da asidiktir, ancak, kitin ve kitosan baziktir. Kitin oldukça hidrofobiktir, suda ve organik çözücülerin çoğunda çözünmez. Mineral asitlerin sulu çözeltileriyle konjuge olan heksafloroizopropanolde, heksafloroasetonda, kloroalkollerde ve %5 lityum klorit içeren dimetilasetamidde çözünür. Kitinin deasetillenmiş ürünü olan kitosan ise asetik asit, formik asit gibi seyreltik asitlerde çözünür (Kumar, 2000).

Kitin çözünürlüğü ve düşük kimyasal reaktivitesi ile selüloza benzeyen oldukça zor çözünen bir maddedir. Selülozdaki iki numaralı karbona bağlı hidroksil grubunun asetillenmiş amid grubu ile yer değiştirmesinin dışında kitin yapısal olarak selüloza benzer (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Selülozun kimyasal yapısı

Kitinin N-deasetillenmiş formu olan kitosan deasetilasyon yolu ile kitinden türemiştir. Başka bir deyişle kitindeki asetillenmiş amid grupları kitosanda amino gruplarına dönüşmüştür (Şekil 3.3). Kitosan kitinin en yaygın kullanılan formudur. Zygomycetes gibi bazı mantarların hücre duvarları kitinin yanı sıra kitosan da içermektedir (Muzzarelli, 1977; Roberts, 1992).



Şekil 3.3 Kitosanın kimyasal yapısı

Kitin ve kitosan evrensel olarak kabul edilmiş toksik olmayan, biyolojik olarak bozunabilen doğal bir polimerdir (Cho vd., 1998).

Kitin ve kitosanın su tutma kapasitesi, yağ bağlama kapasitesi, biyoaktivitesi, indirgenmesi ve sertliği, bu polimerleri çekici birer madde haline getirmiştir (Shahidi vd., 1999).

3.2 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 bulunan ve kolayca elde edilebilen formdur. Bu formda moleküller antiparalel bir şekilde sıralanır (Minke ve Blackwell, 1978). Bu moleküler düzen güçlü moleküller arası H bağları oluşumu için uygundur ve α kitin üç kristal yapının içinde en stabil olan formdur.

β kitinde moleküller paralel bir düzende toplanır, bu da daha zayıf moleküller arası güçlere sebep olur (Gardner ve Blackwell, 1975; Mazeau vd., 1994). Bu yüzden β kitinin α kitine göre daha az kararlı olduğu düşünülmektedir. Çözülme ve şişme 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, kristaller arası biçim değişiminin asit konsantrasyonuna bağlı olduğunu açığa çıkarmıştır (Saito vd., 1997).

α ve β kitinlere nazaran γ kitin daha nadir bulunmaktadır. γ kitinin, α ve β formlarının bir karışımı veya ara formu olduğu düşünülmektedir. γ kitin hem paralel hem de antiparalel bir düzene sahiptir (Zakkaria, 1997; Muzzarelli, 1999).

Farklı polimerik formlar farklı koşullar altında kullanılır. Örneğin α kitin bu üç polimerik form arasında en sert olanıdır ve eklem bacaklıların dış iskeletlerinde, mollusk kabuklarında ve planktonlarda bulunur. Diğer yandan β ve γ kitin, esnekliğin ve yumuşaklığın gerektiği bölgelerde bulunur. β kitin fungal hücre duvarlarının temel bileşenidir. γ kitin ise mürekkep balığının mide duvarında bulunur (Zakkaria, 1997; Muzzarelli, 1999).

3.3 Kitinin ve Türevlerinin Eldesi

Kitin, yengeç ve karides kabuklarından ve mantar misellerinden kolayca elde edilmektedir. Mantar misellerinden elde edilmesinde, kitosan-glukan bileşiklerinin üretimi fermantasyon yolu ile yapılır ve alkaliyle muamele gerekmektedir. Alkali, eşzamanlı olarak proteini uzaklaştırır ve kitini deasetiller. Alkali konsantrasyonuna bağlı olarak bazı çözünür glukanlar uzaklaştırılır. Kabukluların kabuklarının işlenmesi esas olarak proteinlerin uzaklaştırılması ve özellikle yengeç kabuklarında yüksek oranda bulunan kalsiyum karbonatın eritilmesinden oluşmaktadır. Ortaya çıkan kitin %40'lık sodyum hidroksitte 120°C'de 1-3 saat deasetillenir. Bu işlem sonunda %70 deasetillenmiş kitosan oluşur (Kumar, 2000; Synowiecki ve Al-Khateeb, 2003).

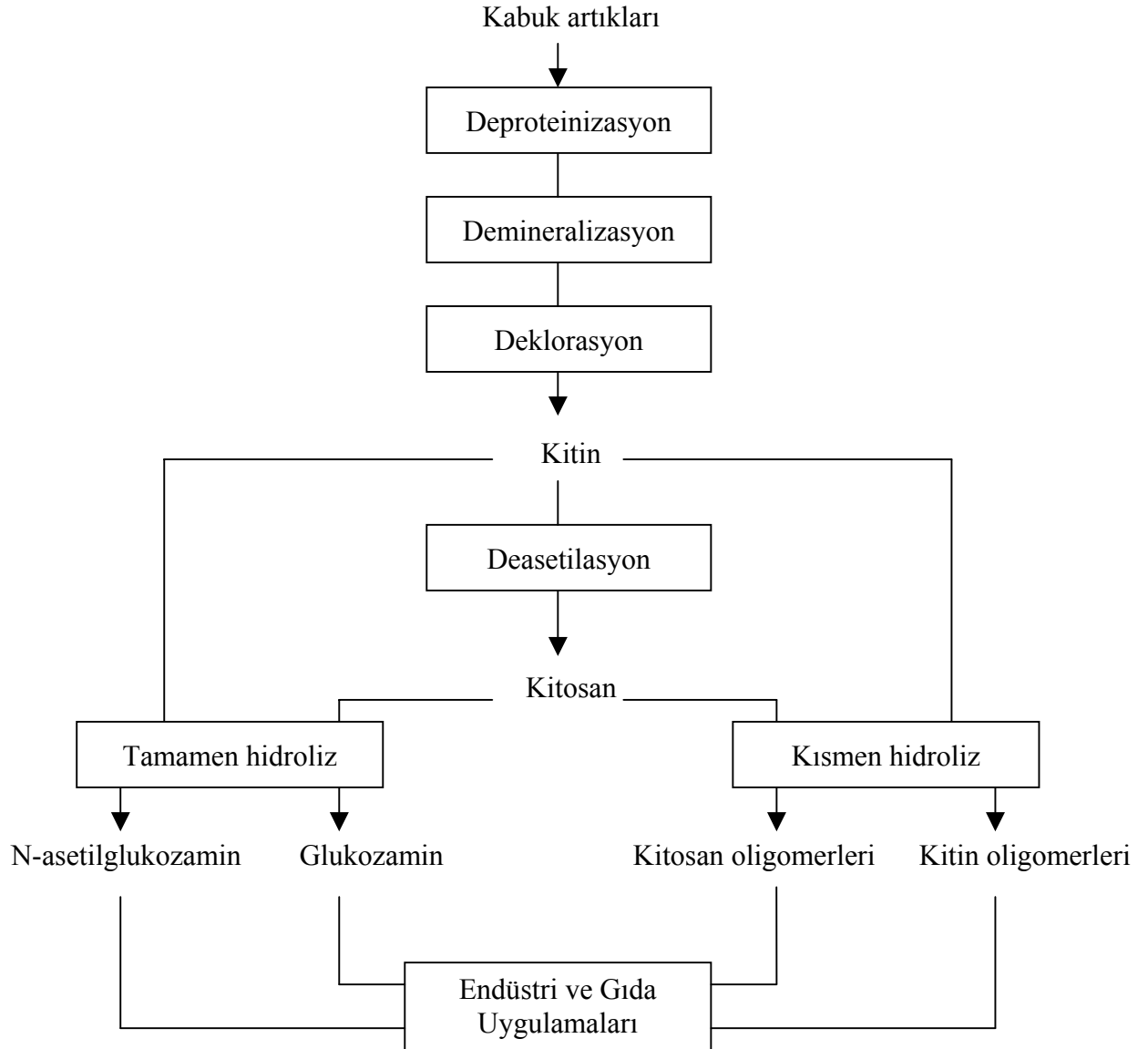
Krustase kabuk atıklarının %30-40'ı protein, %30-50'si kalsiyum karbonat, %20-30'u

kitinden oluşmaktadır. Bu oranlar türler ve mevsimlere bağlı olarak da değişim göstermektedir (Cho vd., 1998).

Kabuk artıklardan kitin eldesi için, kabuk artıkları alkali ve asit ile muamele edilerek, bu artıklardan protein ve mineral maddelerin uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Sonuçta uygun işleme metotları uygulanarak yüksek kalitede kitin elde edilebilmektedir (Pinelli vd., 1998)

Kabuklu atıklardan kitinin izolasyonu üç basamaktan oluşmaktadır (Şekil 3.4) (Shahidi vd., 1999):

1. Protein ayrımı: Uygun bir alkali ile deproteinizasyon
2. Kalsiyum karbonat (ve kalsiyum fosfat) ayrımı: Uygun bir asit ile deminerilazsyon
3. Renk ayrımı: Sodyum hipoklorit ile deklorasyon



Şekil 3.4 Kabuk artıklarından kitin, kitosan ve monomer ve oligomerlerinin elde edilmesi (Shahidi vd., 1999)

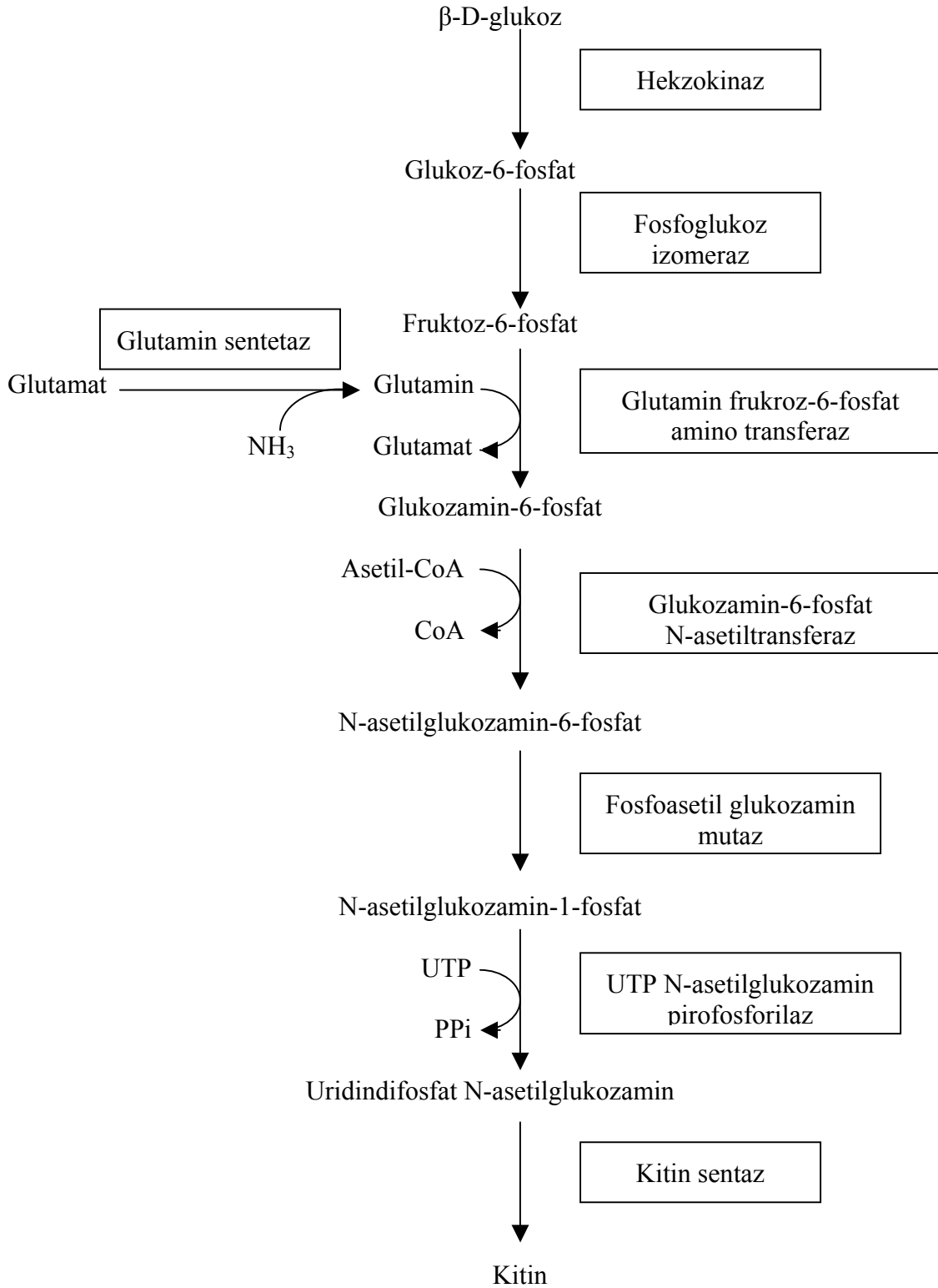
3.4 Kitinin Enzimatik Biyosentezi

Kitin sentezi substrat olarak UDP-N-asetilglukozamin monomerlerini kullanan kitin sentaz enzimi [E.C. 2.4.1.16] tarafından katalizlenmektedir. Bu enzim sadece Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Ca^{+2} gibi iki değerlikli katyonların varlığında aktive olur (Merzendorfer ve Zimoch, 2003).

Candy ve Kilby tarafından 1962’de önerilen glukozdan kitin oluşumunun biyosentez yolu, devam eden radyoaktif işaretli öncül madde çalışmalarıyla desteklenmektedir. Bununla birlikte böceklerde kitin biyosentezinin genetik ve biyokimyasal çalışmaları tamamlanmamakla birlikte genel olarak aydınlatılmıştır (Merzendorfer ve Zimoch, 2003).

Kitin biyosentezi heksozamin yolu üzerinden meydana gelmektedir. Heksozamin yolunda fruktoz-6-fosfat UDP-N-asetilglukozamine dönüştürülür. UDP-N-asetilglukozamin de kitin sentaz enzimi ile kitin oluşturmak üzere polimerleştirilir. Glukozamin-6-fosfat N-asetiltransferaz (GNA) [EC: 2.3.1.4] heksozamin yolunda görevli enzimlerden biridir ve glukozamin-6-fosfatın birinci amin grubuna Asetil-CoA’dan aldığı asetil gruplarının transferini gerçekleştirir (Candy ve Kilby, 1962; Kramer ve Koga, 1986).

Kitin biyosentezi ve bu biyosentezde görev yapan enzimler Şekil 3.5’de özetlenmiştir.



Şekil 3.5 Kitinin enzimatik biyosentezi (Candy ve Kilby,1962; Kramer ve Koga,1986)

3.5 Kitin ve Türevlerinin Kullanım Alanları

Kitin ve türevleri (kitosan, kitin ve kitosan oligosakkaritleri) sahip oldukları özellikler sayesinde tıp da dahil pek çok kullanım alanı bulmuştur. Kitin ve kitosanın ticari açıdan ilgi görmesinin başlıca sebebi yüksek oranda (ortalama % 6,98) azot içermeleridir. Bu oran kitini yararlı bir şelatlama (metal tutma) ajanı yapmaktadır. Son yıllarda kitosan, potansiyel bir polisakkarit kaynağı olarak ilgi görmektedir (Kumar,2000; Synowiecki ve Al-Khateeb, 2003).

Son 30 yılda kitin ve kitin türevlerinin tıpta kullanımlarına ilgi yoğunlaşmıştır (Kumar, 2000; Khor ve Lim, 2003; Synowiecki ve Al-Khateeb, 2003). Yapılan araştırmalar kitin ve kitosanın toksik ve alerjik olmadığını göstermiştir. Bu nedenle vücudun bu bileşikleri yabancı bir istilacı olarak görüp kabul etmemesi mümkün değildir. Kitinin biyolojik bozunması ve antifungal özellikleri çevresel ve tarımsal olarak kullanımları için avantajdır (Kumar, 2000).

Kitin kullanımını sınırlayan en büyük etken zayıf çözünürlüğüdür. Bu kısıtlamaya rağmen, kitin ve türevleri pek çok uygulama alanı bulmuştur.

3.5.1 Tıpta Kullanım Alanları

3.5.1.1 Antitümör Ajan Olarak Kullanımları

Suda çözünebilen kitosan antitümör ajanı olarak kullanılmaktadır. Kısmen depolimerize edilmiş kitosanların kemirgen peritoneal makrofajları uyardığı, tümör hücrelerini öldürdüğü ve antitümör aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur (Muzzarelli,1996).

3.5.1.2 Ortopedik/Periodantal Uygulamalar

Son yıllarda, polimer matris-kalsiyum temelli bileşik sistemlerinin, sert doku yerine kullanılabilirlikleri üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Bu tip bileşik sistemlerinin avantajı, kalsiyum bileşiklerinin dağılımını engelleyen polimer matrisin bağlayıcı özelliğinden ileri gelmektedir. Örneğin; polimerin hidroksiapatit ile kombinasyonunun hidroksiapatitin osteo-iletken (kemik-iletken) davranışını maksimuma çıkardığı ve böylece matris emildikçe implantta kemiksi gelişim sağladığı gösterilmiştir. Kemik ve periodantal dolgu malzemesi olarak kullanım potansiyeli olan hidroksiapatit-kitosan mikrosferler (içi boş küresel tanecik) hazırlanmıştır (Sunny vd., 2002). Wan ve arkadaşları, kitin ve kalsiyum türleri arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Hidroksiapatiti kitinde disperse ederek yeni bir hidroksiapatit-kitin kompozit materyal elde etmişlerdir (Khor ve Lim, 2003).

3.5.1.3 Kitin ve Kitosan Bazlı Sargı Malzemeleri

Muzzarelli yeni bir kitosan türevi bulmuştur; 5-metilpirolidinon kitosan. Bu kitosan türevinin tıp alanında kullanılabileceği düşünülmektedir. Yaraya uygulandığında lizozim etkisiyle üretilen oligomer yapıya dönüşmektedir (Muzzarelli vd., 2002). Kitinle ilgili ilk çalışmaların ardından Beschitin® (Unitika) adlı kitin bazlı bir yara sargı bezi Japonya'da piyasaya sürülmüştür. Bu alanda daha bir çok çalışma devam etmektedir (Kumar, 2000).

3.5.1.4 Oftalmoloji (Gözbilim)

İdeal bir kontak lens yapmak için gerekli tüm özellikler kitosan da mevcuttur; optik berraklık, mekanik dayanıklılık, yeterli optik düzeltme, gaz (özellikle oksijen) geçirgenliği, ıslanabilirlik ve bağışıklık sistemine uyumluluk (Kumar, 2000).

3.5.1.5 Kontrollü İlaç Salınımı

Kitosan biyolojik olarak kolayca emilebilir, düşük pH'ta jel yapma özelliğine sahiptir ve toksik değildir. Midede tahrişi engelleyen anti-ülser aktiviteye sahiptir. Ayrıca kitosan bileşikler asit ortamda batmadan şişer. Tüm bu özellikleri ile kitosan ilaç salınımında idealdir (Kumar, 2000).

3.5.1.6 Antimikrobiyal Ajan Olarak Kullanımı

Kitosan en önemli özelliklerinden biri de belli molekül ağırlıklarında sahip olduğu antimikrobiyal aktivitedir ve bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır. Kitosandaki protonlanmış amin grupları mikroorganizmaların negatif yüklü iyonlarını tutarak mikroorganizma gelişimini inhibe etmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalarda ya düşük molekül ağırlıklı kitosan tekstil liflerine uygulanmaktadır ya da kitosan ile selüloz molekülleri birlikte eğrilerek antimikrobiyal özelliğe sahip lif veya film elde edilmektedir (Chung vd., 1998); Lee vd., 1999). Toksik olmaması ve mikroorganizmalara karşı etkinliği göz önüne alındığında kitosanın, pek çok antibiyotik maddenin kullanıldığı hastanelerde, en güvenli ve en etkin antimikrobiyal ajanlardan biri olması beklenmektedir. Hastane çalışanlarına bulaşan hastalıkların geçiş yollarından biri de hastanede kullanılan malzemelerdir. Çalışanları kan yoluyla bulaşan hastalıklardan korumanın yolu da kullandıkları malzemelere kan itici özelliklerin de katılmasıdır. Lee ve Cho yaptıkları çalışmada kitosan ile muamele edilen pamuklu kumaşlarda koloni sayısında %90'a varan azalma tespit etmişlerdir ve kumaşa kan itici özellik kazandırmışlardır (Lee vd., 1999).

3.5.2 Gıda Endüstrisi Uygulamaları

Kitin, kitosan ve türevleri gıda endüstrisinde de geniş bir uygulama alanına sahiptir. Bakteri ve küf gelişimini önleyici antimikrobiyal madde olma özellikleriyle tarımsal hammaddelerde küf kontaminasyonunun ölçümünde kullanılmaktadırlar. Gıda endüstrisinde; gıda ve çevre arasında nem transferinin kontrolünde, antioksidanların, tatlandırıcıların geliştirilmesinde, meyvelerde enzimatik kararmanın kontrol edilmesinde kullanılır. Katkı maddesi olarak; içeceklerin ve meyvelerin asitlendirilmesinde, doğal tatlandırıcıların artırılmasında kullanılırlar. Ayrıca yüksek kolesterolü azaltıcı etkilerinin olduğu bilinmektedir. Kabuklu ve balık beslenmesinde katkı maddesi olarak, tek hücre proteini üretiminde, gastrit önleyici madde olarak da kullanılmaktadırlar (Shahidi vd., 1999).

3.5.3 Çevre ve Kirlilik Kontrolü Uygulamaları

Kitin ve türevleri özellikle kitosan atık suların temizlenmesinde ağır metal şelatlama ajanı olarak geniş çapta kullanılmaktadır (Cohen ve Chet, 1998; Kumar, 2000). Ayrıca atık sulardan pestisitlerin ve fenollerin geri kazanılmasında, renklendiricilerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadırlar (Shahidi vd., 1999).

Kitin ve türevlerinin diğer uygulama alanları ise kozmetik endüstrisi, kağıt endüstrisi, fotoğrafçılık ve veterinerliktir (Spindler vd., 1990; Georgopapadakou ve Tkacz, 1995; Hirano, 1996; Cohen ve Chet, 1998; Kumar, 2000).

4. KİTİN YIKIMINDAN SORUMLU ENZİMLER

IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) Enzim Nomenklatur Komitesi tarafından 1992’de son olarak düzenlenen sınıflandırmaya göre iki kitinolitik enzim kabul edilmiştir. Bunlar; kitinaz [E.C. 3.2.1.14] ve β -N-Asetilheksozaminidazların içinde yer alan N-Asetilglukozaminidaz [E.C. 3.2.1.30]’dır. Bir başka kategoride kitobiyohidrolazlar bulunmakla beraber henüz sınıflandırma numarasına sahip değildirler (Patil vd., 2000).

Ekzo-hidrolitik enzimler esas olarak polimerlere etki ederler ve afiniteleri substrat uzunluğunun azalması ile azalır. Diğer yandan glikozidazlar dimerler üzerine daha fazla afiniteye sahiptir ve K_m değeri zincir uzunluğunun artışı ile artar. Bu enzimlerin çoğu polimerik substratlar üzerine etki etmede zayıftırlar. Bu bilgiler ışığında yeni düzenleme ile N-asetilglukozaminidazlar N-asetilheksozaminidazların [E.C. 3.2.1.52] sınıfına sokulmuştur (Rast, 1993).

Glikozil hidrolazların amino asit dizilimlerine bağlı olarak, Henrissat, kitinazları ve N-asetilheksozaminidazları 18, 19 ve 20 olmak üzere üç ailede gruplamıştır. Glikozil hidrolazların 18. ve 19. ailesine ait olan kitinazlar virus, bakteri, mantar, böcek ve bitki gibi farklı kaynaklardan elde edilir (Henrissat, 1991).

Kitinin tam olarak enzimatik hidrolizi sonucu bağımsız N-asetilglukozamin (GlcNAc) birimleri oluşur. Bu hidroliz kitinolitik bir sistem tarafından gerçekleştirilir. Bu sistemdeki enzimlerin etkilerinin sinerjik ve ardışık olduğu bilinmektedir (Deshpande, 1986; Shaikh ve Deshpande, 1993).

Kitinolitik enzimler biyoteknolojik uygulamalar için büyük bir öneme sahiptirler. Özellikle, kitinazlar bitki patojenlerini kontrol amaçlı olarak tarımda kullanılırlar. Kitinazlar ve kitinin enzimatik hidrolizi ile oluşan kitooligomerler aynı zamanda insana sağlığının korunmasında kullanılabilirler (Patil vd., 2000).

4.1 Kitinazlar

Kitinazlar [E.C.3.2.1.14] kitin homopolimeri üzerinde hidrolitik aktivite gösteren enzimlerdir. Sistemik adı poli [1,4-(N-asetil- β -D-glukozamin)] glukanohidrolaz olan kitinaz, kitin ve kitodekstrinlerdeki β -(1,4) bağları ile bağlanmış N-asetil- β -D-glukozamin polimerlerinin rastgele hidrolizini katalizler (Zechmeister ve Tóth, 1939; Tracey, 1955; Fischer ve Stein, 1960). En yaygın kullanılan isimlendirme kitinaz olmakla birlikte; 1,4- β -poli-N-asetilglukozaminidaz, poli- β -glukozaminidaz, kitodekstrinaz olarak da isimlendirilirler [6].

4.2 Kitinazların Rolü

Farklı organizmalar büyük çeşitlilikte hidrolitik enzimleri üretirler. Bu enzimler farklı substrat spesifiklikleri gösterir ve diğer özellikleri ile çeşitli fonksiyonlar üstlenirler. Bakterilerde kitinazlar, beslenme ve mantar, protozoa ve omurgasızlara karşı parazitlikte rol oynarlar. Aynı zamanda morfogenezin de kapsamındadırlar. Kitinazlar, bitki ve omurgalıların savunma mekanizmalarında da görevlidirler. Böcek zararlılarının biyolojik kontrolünde kullanılan baculoviruslar patojenik etki için kitinaz üretirler (Gooday, 1995).

İnsan serumunda da kitinaz aktivitesi tanımlanmıştır. Bunun muhtemelen mantar kaynaklı patojenlere karşı savunmada rolü olduğu düşünülmektedir (Escott vd., 1996; Aerts vd., 1996).

Kitotriosidaz enzimi, Gaucher hastalığının markırı olarak kullanılır. Bu hastalıkta bir bozukluk olarak kitotriosidaz lizozomlarda depolanır (Aerts vd., 1996).

4.3 Kitinazların Sınıflandırılması

Selüloz ve kitin yapısal benzerlikler paylaştıkları halde, kendi hidrolitik enzimleri olan selüloz ve kitinazın farklı özellikleri vardır. IUBMB'nin Nomenklatur Komitesi tarafından sınıflandırma ve terminolojileri yapılmıştır.

1978'de Nomenklatur Komitesi spesifik kitobiyoz hidroliz enzimi olan kitobiyazı [E.C. 3.2.1.29] sınıfından çıkardı ve β -N-asetilglukozaminidazların [E.C. 3.2.1.30] içine dahil etti. Sığır beyni ve bitkilerden elde edilen yeni bir grup enzimin, glukozidler, galaktozidler ve birkaç yüksek oligosakkaridi indirgenmemiş uç kısımlarından hidroliz edebildiği bulundu. Bu enzimler β -N-asetilheksozaminidaz (β -N-asetil-D-heksozamin N-asetilheksozaminohidrolaz, [E.C. 3.2.1.52]) olarak isimlendirilerek sınıflandırıldı. 1992'de Enzim Nomenklatur Komitesi N-asetilglukozaminidazları [E.C. 3.2.1.30] selüloolitik enzimlerden ayırdı ve N-asetilheksozaminidazlarla [E.C. 3.2.1.52] birleştirdi (Patil vd., 2000).

Ekzo-hidrolitik enzimler esasen polimerlere etki ederler ve afiniteleri substratın zincir uzunluğunun azalması ile azalır. Diğer yandan glikosidazlar dimerler üzerine daha fazla afiniteye sahiptir ve K_m değeri zincir uzunluğunun artışı ile artar bu nedenle bu enzimlerin çoğu polimerik substratlar üzerine etki etmede zayıftırlar. Bu bilgilerin ışığında yeni bir düzenleme ile N-asetilglukozaminidazlar N-asetilheksozaminidaz sınıfına sokulmuştur (Rast, 1993).

4.3.1 Aminoasit Dizilimlerine Dayanarak Kitinazların Sınıflandırılması

IUBMB sınıflandırması bu enzimlerin evrensel akrabalıklarını anlamak için yardımcı değildir. Glikozil hidrolazların aminoasit dizilimlerine bağlı olarak Henrissat, kitinazları ve N-asetilheksozaminidazları 18, 19 ve 20 olmak üzere üç ailede grupladı (Henrissat, 1991). 18 ve 19. aileler virus, bakteri, mantar, böcek ve bitki gibi farklı kaynaklardan elde edilen endo-kitinazdan oluşmaktadır. 19. aile esasen bitki kitinazlarından oluşmaktadır. *Vibrio harveyi*'den elde edilen N-asetilglukozaminidazlar [E.C. 3.2.1.30] ve *Dictyostelium discoideum* ile insanlardan elde edilen N-asetilheksozaminidazlar [E.C. 3.2.1.52] 20. aile içinde gruplandırılmıştır. 1993'te Henrissat ve Bairoch dizi ekleme çalışmaları yaptılar ve *Flavobacterium* türlerinden elde edilen endo-N-asetilglukozaminidazları [E.C. 3.2.1.96] 18. aile içine aldılar. Endo-N-asetilglukozaminidazların mannozil glukoproteinlerdeki β -1,4-N-GlcNAc bağları üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir (Henrissat ve Bairoch, 1993).

Kitinaz genlerinin diziliminin tanımlanmasının yardımıyla, Perrakis ve arkadaşları, kitinazları iki ayrı sınıf içinde grupladı; Sınıf I ve Sınıf II. Henrissat'ın glikozil hidrolazları 19. ve 18. aile olarak sınıflandırmasına benzer olarak Sınıf I, 19. aileye ve Sınıf II ise, 18. aileye karşılık gelmektedir (Henrissat, 1991; Perrakis vd., 1993).

Bitkiler, patojenlere karşı savunma cevabı olarak, büyük miktarda kitinaz izoenzimleri üretirler. Bu izoenzimler dokulara özgüdür ve dokuların gelişimlerine bağlı olarak düzenlenirler. Dizi özelliklerine göre altı sınıf içinde sınıflandırılırlar (Iseli vd., 1996).

Kitinazların sınıflandırılmasında tanımlayıcı karakteristik özellikler:

- N-terminal dizisi
- Enzimin lokalizasyonu
- İzoelektrik pH'sı
- Sinyal peptid
- İndükleyici moleküldür (Flach vd., 1992).

Bu özelliklere göre kitinaz izoenzimleri dizi özelliklerine göre 6 sınıfa ayrılırlar. Örneğin, Sınıf I'e ait kitinazların karakteristik özellikleri; sisteinden zengin N terminal bölgeleri, lösin ya da valinden zengin sinyal peptidleri ve vakuol içindeki lokalizasyonlarıdır. Ayrıca, bazik ve asidik doğasına göre sırasıyla Sınıf Ia ve Sınıf Ib olarak alt gruplara ayrılır. Bitki kitinazları Sınıf I'i oluşturur. Sınıf II enzimleri ise bitki, mantar ve bakteri kaynaklıdır. Sınıf II

kitinazları Sınıf I kitinazları ile benzer dizi sırasına sahiptir fakat sisteince zengin N-terminal domainleri bulunmamakla birlikte patojen kaynaklıdır. Sınıf I kitinazlarının çoğu endo-kitinazdır, Sınıf II kitinazları ise ekzo-etkin kitinazlardır. Fakat bu hipotez için kesin kanıtlar henüz bulunmamaktadır. Sınıf III kitinazları, Sınıf I ve Sınıf II kitinazları ile dizi benzerliği göstermezler (Collinge vd., 1993). Bununla birlikte Sınıf IV kitinazları, Sınıf I kitinazlarının sahip olduğu immunolojik özelliklere benzer karakteristik özelliklere sahiptirler fakat önemli derecede Sınıf I kitinazlarından daha kısa bir primer yapıya sahiptirler (Collinge vd., 1993). Sınıf V ve Sınıf VI ise basit örnekleri kapsamaktadır. Sınıf V içinde yer alan ısırganotu lectin öncülü, ard arda sıralanmış, iki kitin bağlayan domaini içerir (Iseli vd., 1996). Aminoasit dizi verilerine bağlı olarak, kitin bağlayan sisteince zengin domainin, yüksek bitkilerin evrimi sırasında kaybolduğu önerilmektedir. Isırganotu lektini, azalmış selektif basınç nedeniyle katalitik domaininin fonksiyonu kaybolmuş bu nedenle daha hızlı evrimleşmiştir (Iseli vd., 1996).

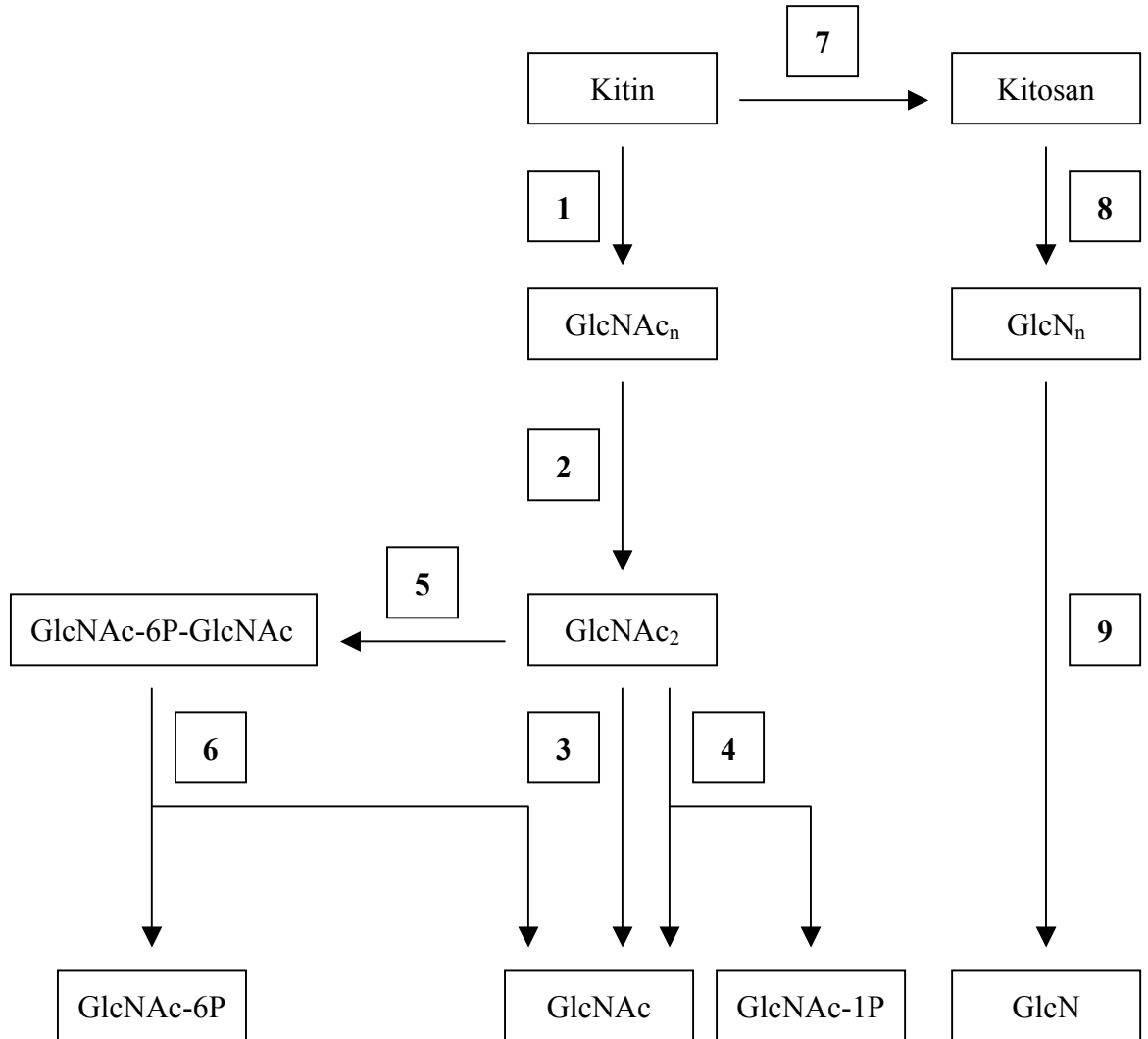
Tüm bu üç sınıflandırma sistemine göre, kitinazların IUB sınıflandırması için kullanılan kriterler önemlidir. Çünkü sonuçta enzim tarafından katalizlenen reaksiyon, enzimin rolünün anlaşılması ve biyoteknolojik uygulamaları için anahtar bir bilgi oluşturur (Patil vd., 2000).

4.4 Kitinin Enzimatik Hidrolizi

Kitin ve selüloz gibi polisakkaritlerin enzimatik hidrolizi çeşitli enzimlerin birlikteliğini gerektiren kompleks bir işlemdir. Genel olarak bu enzimler polisiakkarit zincirini rastgele bir yerinden hidrolizleyen endo-enzimler ve zincirin ucunda ya da ucuna yakın olan bir bölgede etkin olan ekzo-enzimler olarak iki grupta incelenebilir. Enzimatik reaksiyonun yönü tipik olarak indirgenmiş uç gruplarının konsantrasyonunu ölçen çeşitli kolorimetrik tayinlerden faydalanılarak izlenir (Horn ve Eijssink, 2004).

Birçok bitki, böcek ve mikroorganizma kitinin yıkımından sorumlu olan kitinolitik enzim sistemine sahiptir (Patil vd., 2000). Kitinin bilinen enzimatik yıkımı Şekil 3.1’de özetlenmiştir (Tanaka vd., 2003). Kitin ilk aşamada endo ve ekzo-kitinazların kombinasyonu ile glukozamin dimerlerine (GlcNAc_2) parçalanır (reaksiyon 1 ve 2). Daha sonra β -N-Asetilglukozaminidaz (GlcNAcase ; reaksiyon 3) GlcNAc dimerlerini hidrolizler veya kitooligosakkaridlerden GlcNAc ’lerin salınımını gerçekleştirir (Gooday, 1994). Bazı organizmalar GlcNAc_2 ünitelerini GlcNAc_2 fosforilaz enzimi ile GlcNAc ve GlcNAc-1-fosfata parçalar (reaksiyon 4), (Park vd., 2000) veya bir GlcNAc_2 fosfotransferaz sistemi ile dimeri $\text{GlcNAc-6-fosfat-GlcNAc}$ yapısına dönüştürür (reaksiyon 5). Bu yapı

6-fosfo- β -glukozaminidaz ile GlcNAc ve GlcNAc-6-fosfata parçalanır (reaksiyon 6), (Keyhani ve Roseman, 1997; Keyhani vd., 2000). Kitinin yıkımı için bir diğer yol ise kitinin kitin deasetilaz ile deasetilasyonudur (reaksiyon 7). Deasetillenmiş kitin yani kitosan bir endo-etkin enzim olan kitosanaz (reaksiyon 8) ve ekzo- β -D-glukozaminidazın (GlcNase; reaksiyon 9) işbirliği ile glukozamine (GlcN) kadar yıkılır (Gooday, 1994).



Şekil 4.1 Kitinin enzimatik hidrolizi (Tanaka vd., 2003)

4.5 Kitinazların Uygulama Alanları

Kitinazlar farklı preparasyonları ile birçok endüstri ve tarım alanındaki uygulamalarda kullanılırlar (Shaikh ve Deshpande, 1993; Patil vd., 2000). Bu uygulama alanlarının başında bitkilerdeki patojenik mantarlara karşı biyokontrol, kitin oligosakkaritlerinin üretimi ve tek hücre proteini üretimi gelmektedir (Patil vd., 2000).

4.5.1 Biyokontrolde Kullanımları

Böceklerin dış kabukları ve patojenik küf mantarlarının hücre duvarları kitin içerdiğinden bitkiler savunma cevabı olarak kitinaz indüksiyonunu gerçekleştirirler (Kombrink ve Somssich, 1995). En çok çalışılan mikoparazitik mantar olan *T. harzianum* kitinolitik enzimlerinin diğer kaynaklardan elde edilen enzimlerinkinden daha geniş bir patojenik mantar aralığına inhibitör etkisinin olduğu bulunmuştur (Lorito ve., 1993). Kitinaz üreten mikroorganizmaların biyokontrolde kullanılmaları ya direkt olarak bitki ile bulaştırılmalarını ya da kitinaz enzimini kodlayan genlerinin bitkilere transgen olarak sokulmalarını kapsamaktadır (Chet, 1993; Harman ve Kubicek, 1998; Lorito vd., 1998; Harman, 2000).

4.5.2 Kitooligosakkaritlerin Üretimi

Kitooligosakkaritler bitki savunmasında ortaya çıkan maddelerdir ve tıpta önemli bir kullanım alanları vardır. Örneğin; kitoheksoz ve kitoheptoz anti-tümör etkisi gösterir. *Vibrio alginolyticus*'tan elde edilen kitinaz koloidal kitinden kitopentoz ve kitotrioz meydana getirir (Murao vd., 1992). GlcNAc kendi başına anti-inflamatuar bir maddedir. İnsan vücudunda glukozdan sentez edilir ve glikoprotein ve glikozaminoglikanlara bağlı olarak bulunur. Sentetik olarak eldesi için ise yüksek miktarlarda ekzo-kitinaz ve N-asetilglukozaminidazlara ihtiyaç vardır (Aloise vd., 1996).

4.5.3 Diğer Uygulamalar

Tek hücre proteini üretimi ve biyoteknolojide kullanılan bir çok kitin türevinin hazırlanmasında kitinazlar kullanılmaktadır (Revahmoiseev ve Carroad, 1981; Kumar, 2000).

5. MATERYAL VE METODLAR

5.1 Deneysel Çalışmada Kullanılan Materyaller

5.1.1 Kullanılan Aletler

- Sterilizasyon işlemi için:
Fissler marka 10 L hacimli düdüklü tencere
- Enzim üretimini sağlamak için yapılan çalışmada fermentasyon şartlarını sağlamak için:
Nüve marka çalkalamalı su banyosu
- Enzim aktivitesinin tayini için:
Philips PU 8740 UV/VIS Spektrofotometre
- Çöktürme işlemleri için:
Nüve NF 615 santrifüj
- İnkübasyon amaçlı kullanılan:
Memmert etüv
- CyberScan 500 pHmetre
- Gec Avery-UK hassas terazi

5.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Madde adı	Firma adı
Amonyum sülfat	LaChema
N-Asetilglukozamin	Sigma
Aseton	Merck
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 dekstroza agar	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
Trikloroasetik asit	Sigma

5.2 Deneyisel Çalışmada Kullanılan Metodlar

5.2.1 Protein Miktarının Belirlenmesi

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

Renk Reaktifinin Hazırlanması:

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

5.2.1.1 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.

Eppendorf tüpleri içine hazırlanan seyreltilmiş protein standartlarından 800 µL ve renk reaktifinden 200 µL pipetlendi. Kör çözelti tüpüne ise 800 µL distile su 200 µL renk reaktifi pipetlendi. Tüpler birkaç kez yavaşça karıştırıldı. 5 dakika ile 1 saat aralığında kör çözeltiye göre 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

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 5.1).

Çizilen standart eğrinin regresyon denklemi aşağıda verilmiştir.

$$y = 0,2218x + 0,0077 \quad (5.1)$$

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

5.2.2 Dinitrosalisilik Asit Metodu İle İndirgen Şeker Tayini

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

5.2.2.1 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. Distile 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 sodyum potasyum tartarat 1 litre distile suda çözüldü. Çözelti koyu renkli bir şişede saklanmalıdır.

Sonlandırma Çözeltisi:

2,5 M NaOH hazırlandı.

5.2.2.2 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 N-asetilglukozamin 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 çizildi (Şekil 5.2).

Çizilen standart eğrinin regresyon denklemi aşağıda verilmiştir.

$$y = 1,2885x + 0,0014 \quad (5.2)$$

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 6.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan) ve 500 µL örnek eklendi. Kör çözelti ise tüpüne 1500 µL sitrat tamponu (pH 5) eklendi.
2. Boş deneme tüplerine 1000 µL 2,5 M NaOH eklendi.
3. Tüpler, 50 °C’deki su banyosunda 30 dakika bekletildi.
4. Su banyosundan çıkarılan tüplerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Daha sonra 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 gelen tüplere 15 mL distile su eklendi.
8. 540 nm’de kör çözeltiye göre boş deneme ve örnek absorbansları okundu.

Örneklerdeki indirgen şeker miktarını bulmak için örnek ve boş deneme çözeltilerinin absorbans farklarına karşılık gelen değer N-asetilglukozamin standart eğrisinden okundu. Bu şekilde örneklerdeki N-asetilglukozamin miktarı mg/mL olarak bulundu.

5.2.2.3 Total Ünitenin Hesaplanması

Şekil 5.2’deki N-asetilglukozamin standart eğrisi kullanılarak bulunan indirgen şeker miktarı aşağıdaki denklemde yerine yazılarak total ünite (U/mL) hesaplanır.

$$\text{Total Ünite (U/mL)} = [(\text{mg indirgen şeker} / \text{mL} \times 1000) / (t \times M_G)] \quad (5.3)$$

mg indirgen şeker/mL : Örneklerin ve boş denemelerin absorbansları arasındaki farka karşılık

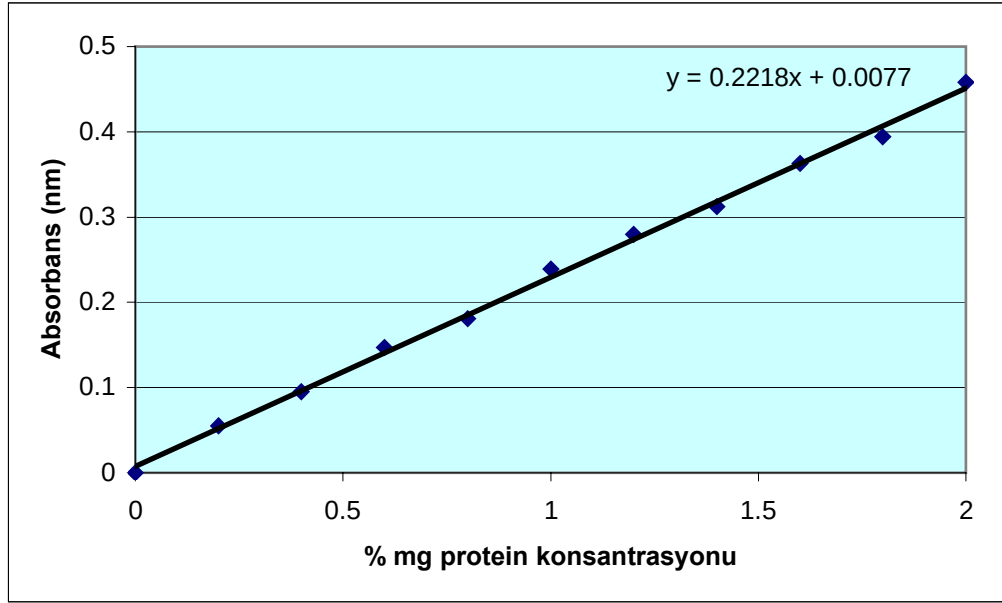
gelen indirgen şeker miktarı

t : İnkübasyon zamanı (30 dakika)

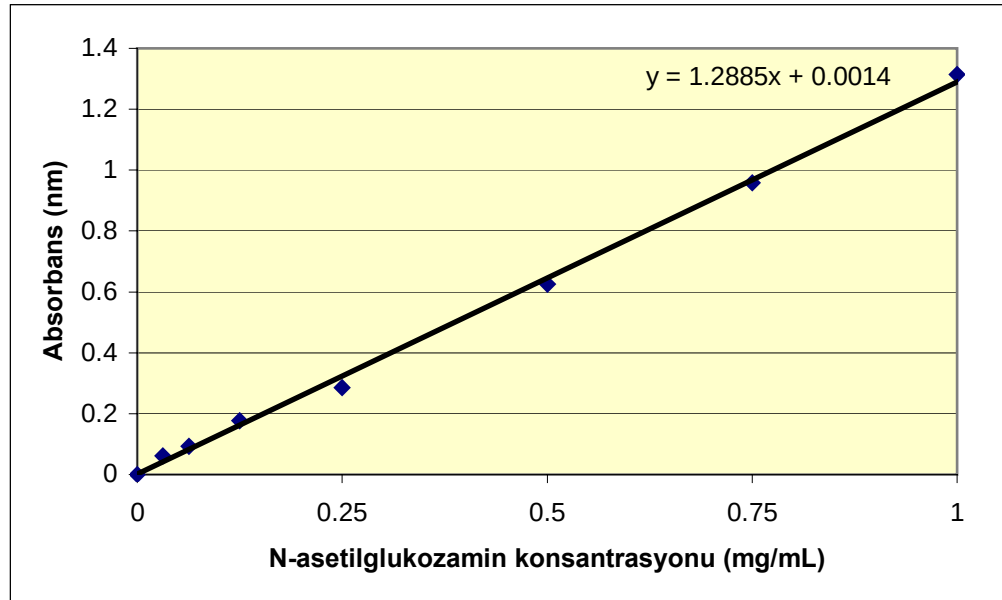
M_G : Serbest kalan indirgen şekerin (N-asetilglukozamin) molekül ağırlığı
(221 g/mol)

5.2.2.4 Spesifik Aktivitenin Hesaplanması

Total ünitenin mL'deki protein miktarına bölünmesi ile spesifik aktivite hesaplanır. Spesifik aktivitenin birimi ise U/mg'dır.



Şekil 5.1 Total protein standart eğrisi



Şekil 5.2 N-asetilglukozamin standart eğrisi

5.2.3 Çöktürme Yöntemleri

Çöktürme işlemleri genelde proteinleri bulundukları çözeltiden ayırmak ve konsantre etmek için kullanılır. Protein çöktürülmesinin az miktarda uygun bir çözücü içinde süspanse edilmesi ile başlangıçtakine göre daha yüksek konsantrasyonda bir protein çözeltisi elde edilmiş olur. Kullanılan kimyasalın tipine ve işlemin amacına göre iki farklı uygulama söz konusudur:

1. Analitik amaçlı çöktürme için trikloroasetik asit (TCA) veya organik çözücüler (aseton, etanol, metanol) kullanılır.
2. Preparatif amaçlı çöktürme için tuzlar (örneğin, amonyum sülfat), organik çözücüler (aseton, etanol, metanol) veya polietilen glikol (PEG) gibi organik polimerler kullanılır.

5.2.3.1 TCA ile Çöktürme

Kuvvetli bir asit olan TCA, proteindeki aminoasitlerin yan zincirlerindeki iyonik grupların yüklerini değiştirerek iç elektrostatik dengeyi bozar ve proteinin denatürasyonuna yol açar. Denatüre olan proteinler, çözünürlükleri değişeceğinden çökerler.

5.2.3.2 Organik Çözücüler ile Çöktürme

Aseton, etanol, metanol gibi organik çözücüler proteinlerin çözünürlüğünü azaltarak çökmelerine yol açarlar. 10 °C'nin üzerinde hızla denatürasyona yol açacaklarından, işlem soğukta (0-4 °C) gerçekleştirilmelidir.

5.2.3.3 Amonyum Sülfat Tuzu ile Çöktürme

Tuzla çöktürme proteinlerin konsantre edilmesinde ve saflaştırılmasında geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. Ortama eklenecek nötral tuz, genellikle denatürasyona yol açmadan, proteinlerin agregasyonuna (bir araya gelmelerine) ve çözeltiden ayrılarak çökmelerine yol açar. Proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çöktürülerek birbirlerinden ve çözeltideki diğer moleküllerden ayrılabilir. Çöktürme işleminde genellikle etkinliği ve çözünürlüğü yüksek, pH'yı fazla etkilemeyen, çözeltide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve etkin bir tuz olan amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ kullanılır. Bu nedenle yöntem amonyum sülfat çöktürmesi adıyla da bilinmektedir.

Birçok protein %55 amonyum sülfat doygunluğunda çöker. %70 doygunluk genelde tümünün çökmesini sağlar. Çözeltinin istenilen konsantrasyona (% doygunluğa) ulaşması için ortama eklenmesi gereken tuz miktarı standart amonyum sülfat % doygunluk tablosundan hesaplanır.

Bu tablodaki değerler aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

$$X = \frac{505 (S_2 - S_1)}{1 - 0.285S_2} \quad (5.4)$$

X = 1 litre çözeltiye eklenecek gram amonyum sülfat miktarı

S₁ = Amonyum sülfatın başlangıç konsantrasyonu (%)

S₂ = Amonyum sülfatın son konsantrasyonu (%)

Yöntem:

1. 20-50 mL protein çözeltisi içeren beher, manyetik karıştırıcı üzerindeki buz dolu bir kabın içine yerleştirilir.
2. Çözeltiye eklenecek amonyum sülfat miktarı, standart amonyum sülfat doygunluk tablosundan veya yukarıdaki formülden belirlenir ve sürekli karıştırılarak yavaş yavaş ortama katılır.
 - Ticari amonyum sülfat işlem öncesi soğuk havanda iyice toz haline getirilir ve ortama azar azar katılır. Bu sırada çözeltinin rengi koyulaşmaya başlarsa, katım işlemi daha da yavaşlatılır. Ayrıca, amonyum sülfatın nem çekmemiş olması çok önemlidir. Aksi takdirde tartılan miktar hatalı olacaktır.
3. Tuz ilavesi bittikten sonra, 10-60 dakika karıştırmaya devam edilir.
4. 10.000 x g'de 10 dakika veya 3.000 x g'de 30 dakika santrifüjlenerek üst sıvı atılır.
5. Çökelti, kendi hacminin 1-2 katı tamponda çözdürlür.
6. Ortamdaki amonyum sülfat diyaliz, ultrafiltrasyon veya iyon değiştirici kolon yöntemlerinden biri ile uzaklaştırılır.

6. DENEYSEL ÇALIŞMA

6.1 Deneysel Çalışmanın Optimum Koşulları

Deneysel çalışmamızı daha önce belirlenen optimum koşulları göz önüne alarak yaptık. Belirlenen optimum koşullar *Trichoderma atroviride*'nin 6.5'te ve 6.5.2'de anlatıldığı gibi yer değiştirme yöntemi kullanılarak, 30 °C'de, 48 saat sonunda çalkalamalı inkübasyonu sonucu maksimum kitinaz enzimi aktivitesini gerçekleştirdiğidir. Enzim indüksiyonu için % 0,1'lik kolloidal kitin ile sağlanmıştır (Orhan, 2005).

6.2 Mikroorganizma Üretim Ortamı (Katı Besiyeri)

Trichoderma atroviride 'nin yetiştirileceği katı besiyeri için 3,9 g patates-dekstroz agar 100 mL distile su ile sıcak su banyosunda karıştırılarak çözüldü. Çözelti 20 dakika 121 °C buharlı basınçta steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra uygun sıcaklığa kadar soğutulan katı besiyeri çözeltisinden yaklaşık 16 mL 9 cm çapındaki steril petri kaplarına dökülerek, katılaşması için soğumaya bırakıldı.

6.3 Saf Kültürün Ekilmesi ve Saklama Koşulları

6.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan katı besi yerlerine saf kültürler spatül yardımıyla ekildi. Herhangi bir kontaminasyona sebebiyet vermemek için ekim işleminin yapıldığı ortam etanol ile dezenfekte edildi ve bek alevi yanında çalışılarak sterilizasyon koşulları sağlanmaya çalışıldı. Ekim işleminden sonra petriler 30 °C de 7 gün inkübasyona bırakıldı. 7 gün sonunda tüm petri kabını dolduran mikroorganizma kültürü inkübatörden alındı.

Bu şekilde hazırlanan kültürler buzdolabında +4 °C'de 3 ay saklanabilir. Kültürün devamlılığını sağlamak için 3 ayda bir alt kültürleme yapılmalıdır.

6.4 Spor Çözeltisinin Hazırlanması

Katı besiyerinde yetiştirilen *Trichoderma atroviride* kültürünün üzerine 5 mL steril distile su eklendi. Misel üzerindeki sporlar spatül yardımıyla kazınarak çözeltiye alındı.

6.5 Çalışmada Kullanılan Sıvı Kültür Ortamları (Sıvı Besiyerleri)

Çalışmada Dana ve arkadaşları (2001) tarafından önerilen sıvı kültür ortamı kullanıldı. Litrede 10 g sakkaroz; 1.4 g (NH₄)₂SO₄; 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 magnetik karıştırıcıda

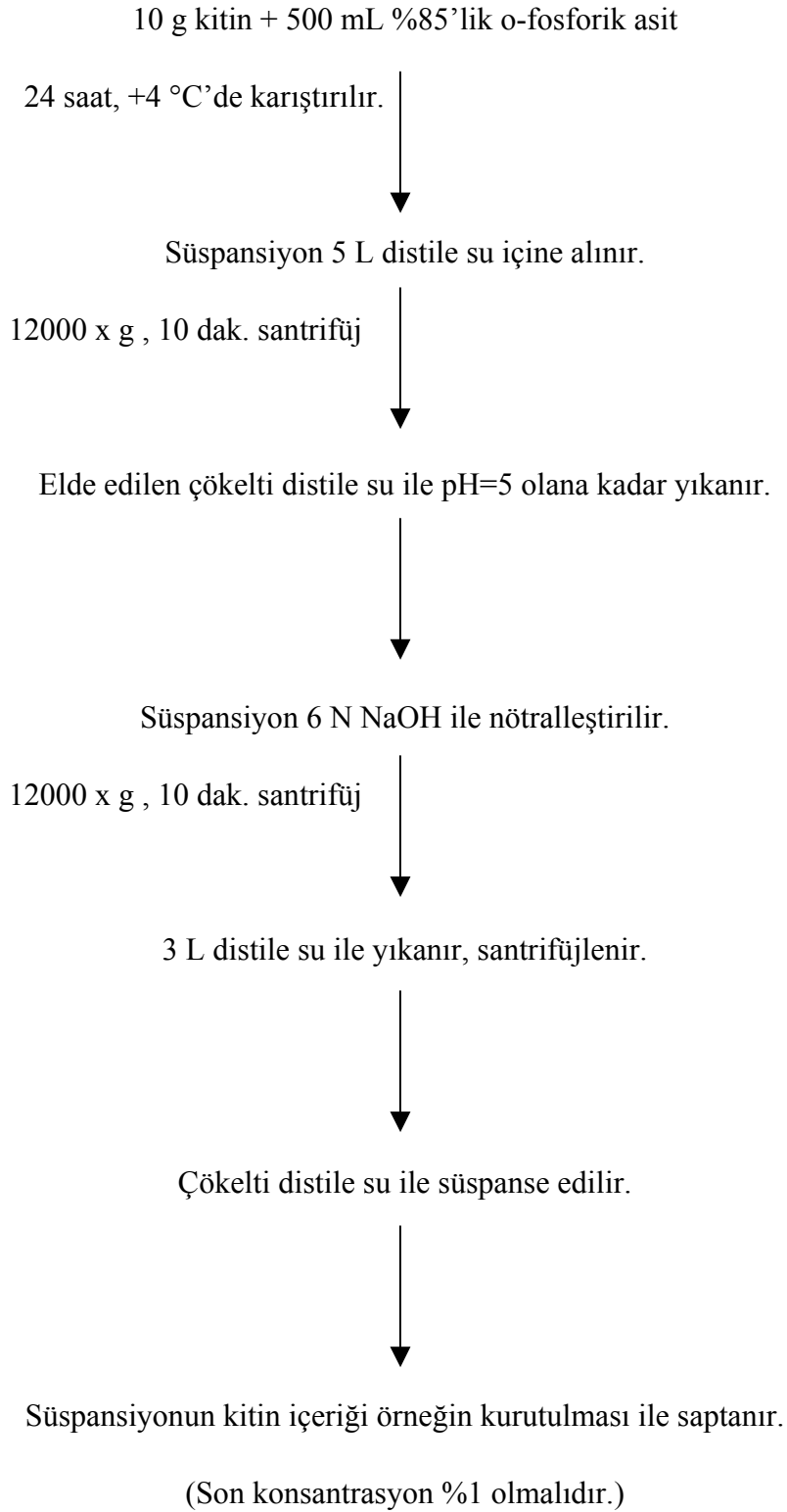
karıştırılarak çözüldü. Çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 5.0'a ayarlandı ve çözelti 250 mL'lik erlenlere 100 mL olarak paylaştırıldı. Sıvı kültür ortamını içeren erlenler 20 dakika 121 °C'de buharlı basınçta steril edildi.

6.5.1 Ön Kültivasyon Ortamı

Kontaminasyona sebebiyet vermemek için sterilizasyon koşulları altında, 6.5'te anlatıldığı gibi hazırlanan 100 mL sıvı besiyeri içeren erlenlere 6.4'de anlatıldığı gibi hazırlanan *T. atroviride* spor çözeltisinden 0.5 mL eklendi. Sporların gelişmesi için erlenler çalkalamalı su banyosunda 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

6.5.2 Enzim Üretim Ortamı (Yerdeğiştirme Yöntemi)

6.5.1'de anlatıldığı gibi ön kültivasyona bırakılarak üretilen *T. atroviride* miselleri süzüldü ve steril distile su ile iki defa yıkandı. Bu miseller %0.1 kolloidal kitin içeren (Şekil 6.1) 100 mL'lik taze hazırlanmış steril enzim üretim ortamına transfer edildi. Çalkalamalı su banyosunda 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Transfer işlemi sterilizasyon koşulları altında gerçekleştirildi.



Şekil 6.1 Kolloidal kitinin hazırlanması (Tanaka ve arkadaşları,1999)

6.6 Çöktürme Yöntemleri

6.6.1 Ham Filtratın Hazırlanması

6.5.2’de anlatıldığı gibi enzim üretim ortamında yetiştirilen *Trichoderma atroviride* kültürlerinin 48 saat sonunda inkübasyonu durduruldu. Çöktürme işlemlerinin uygulanacağı ham filtratın elde edilmesi için, *T. atroviride* miselleri iki katlı temiz bir tülbentten süzüldü. Süzüntü 5000 devir/dakika’da 30 dakika santrifüj edilerek çökelti ve üst sıvı ayrıldı. Santrifüj işlemi sonunda çökelti atıldı ve üst sıvı ham filtrat olarak adlandırıldı.

Elde edilen ham filtratın aktivite ve protein tayini yapıldı. Spesifik kitinaz aktivitesi hesaplandı.

Aktivite kaybını en aza indirmek için tüm işlemler soğukta yapıldı. Kullanılan tüm eşya ve cam malzemeler önceden soğutuldu.

6.6.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

İki farklı amonyum sülfat çöktürme yöntemi uygulandı.

Birinci yöntemde; 5 farklı behere 5 mL ham filtrat alındı. %20, %40, %60, %80 ve %90 doymunluktaki çözeltiler için gerekli olan amonyum sülfat miktarları küçük porsiyonlar halinde katıldı. Karışımlar manyetik karıştırıcıda buz banyosu içinde 15 dakika karıştırıldıktan sonra dengeye gelmesi için bir gece buzdolabında +4 °C’de bekletildi. Daha sonra 5000 devir/dakika’da 20 dakika santrifüj edildi. Çökelti 1 mL pH 5 sitrat tamponu içinde çözüldü. Üst sıvı ve çökeltilerde enzim aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı.

İkinci yöntemde; ham filtrata, konsantrasyonu %20 oluncaya kadar amonyum sülfat küçük porsiyonlar halinde katıldı. Karışım manyetik karıştırıcıda buz banyosu içinde 20 dakika karıştırıldıktan sonra bir gece buzdolabında +4 °C’de bekletildi. Daha sonra 5000 devir/dakika’da 20 dakika soğukta santrifüj edildi. Üst sıvı ve çökelti ayrıldı. Çökelti 1 mL pH 5 sitrat tamponu içinde çözüldü. Üst sıvı ve çökeltilerde enzim aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı. Bu işlemlere, amonyum sülfatın sıvı kısımdaki konsantrasyonu, kademeli olarak her defasında %10 arttırılmak sureti ile %90’a kadar devam edildi. Son olarak %5 arttırılarak %95’lik doymunluktaki çöktürme de uygulandı.

6.6.3 Organik Çözücülerle Çöktürme

Etanol ve aseton olmak üzere iki farklı organik çözücü ile çöktürme yapıldı. Bunun için 5 mL ham ekstrelere önceden soğutulmuş 10 mL ve 20 mL olarak belirlenen hacimlerde etanol veya

aseton ilave edildi. 15 dakika manyetik karıştırıcıda buz banyosu içinde karıştırıldı. Karışımlar 3 saat $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında bekletildi. Daha sonra her bir çöktürme örneği 5000 devir/dakika'da 15 dakika soğukta santrifüj edildi. Üst sıvı ve çökelti ayrılarak çökelti 1 mL sitrat tamponu içinde çözüldü. Üst sıvı ve çökeltide enzim aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı.

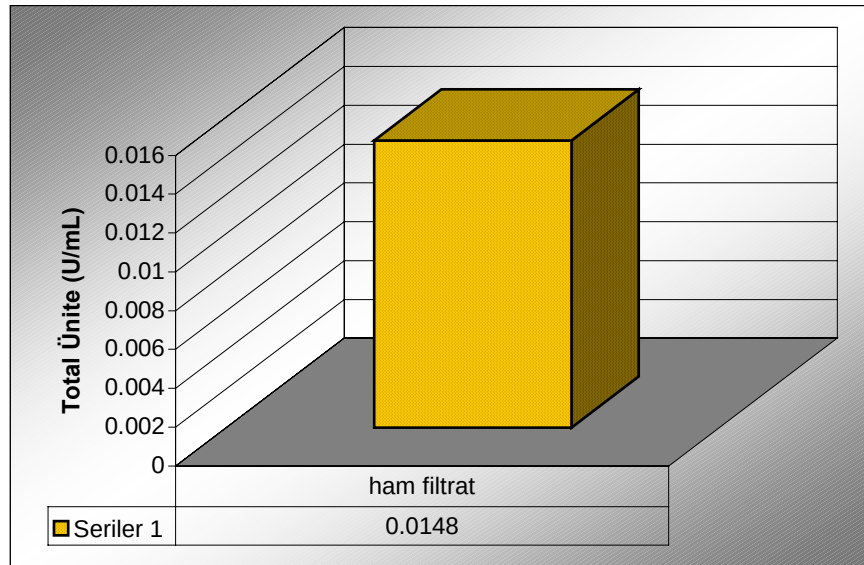
6.6.4 Trikloroasetik Asit (TCA) ile Çöktürme

TCA çöktürmesi için %20 (v/v) ve %40 (v/v) olmak üzere iki farklı konsantrasyon belirlendi. TCA'nın %20'lik ve %40'lık çözeltileri hazırlandı. 5 mL ham filtrata 2 mL önceden soğutulmuş ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) %20 (v/v) ve %40 (v/v) TCA ayrı ayrı eklendi. Dolayısıyla çözeltilerdeki TCA'nın son konsantrasyonları %6 ve %11 oldu. Karışım $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika karıştırıldı. 5000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çok az miktarda gözlenen çökelti 1 mL sitrat tamponunda (pH:5) çözüldü. Üst sıvı ve çökeltide enzim aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı.

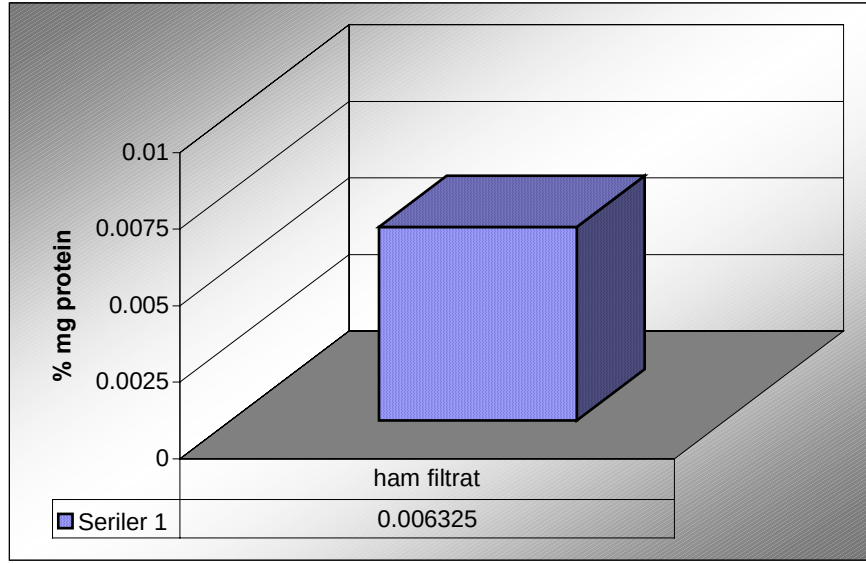
7. SONUÇLAR

7.1 Ham Filtrat Protein Miktarı, Total Ünitesi ve Spesifik Aktivitesi

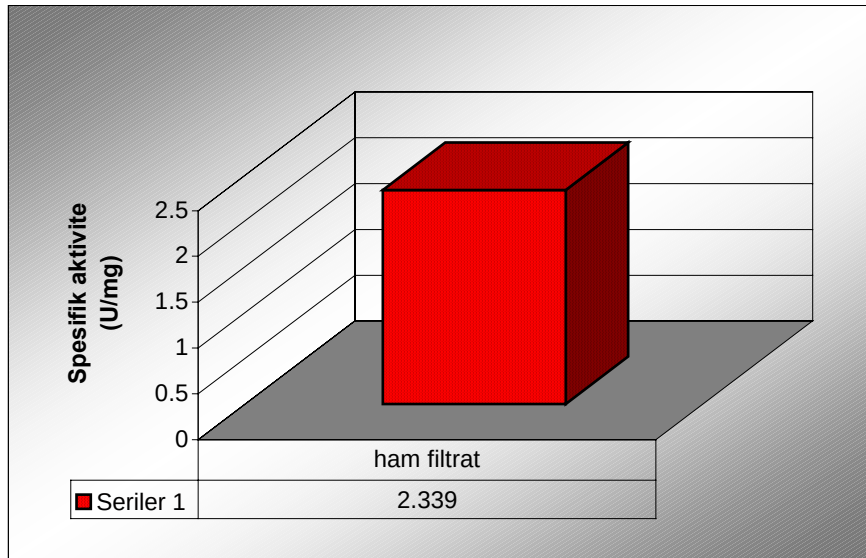
Enzim üretimi için yer değiştirme yöntemi kullanılarak %0,1 koloidal kitin ile desteklenmiş sıvı besiyerinde 30 °C’de inkübasyona bırakılan *Trichoderma* kültürlerinin 48 saat sonunda inkübasyonu durduruldu. 6.6.1’de anlatıldığı gibi elde edilen ham filtratın aktivite ve protein miktarı absorbansları ölçüldü. Bulunan absorbans değerleri standart grafiklerde yerine konularak total ünite ve protein miktarı hesaplandı (Şekil 7.1.1 ve Şekil 7.1.2). Ham filtrat için kitinaz enziminin spesifik aktivitesi 2.339 U/mg olarak bulundu (Şekil 7.1.3).



Şekil 7.1.1 Ham filtrat kitinaz aktivitesi



Şekil 7.1.2 Ham filtrat protein miktarı



Şekil 7.1.3 Ham filtrat spesifik kitinaz aktivitesi

7.2 Farklı Konsantrasyonlardaki Amonyum Sülfat Çöktürmesinin Enzim Aktivitesi ve Protein Miktarına Etkisi

6.6.2’de anlatıldığı gibi ilk yöntem için belirlenen 5 farklı amonyum sülfat konsantrasyonu ile 5 farklı beherde yapılan çöktürme işlemi sonrasında çözeltiler santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı ve çökeltiler ayrıldı. Çökeltiler 1 mL sitrat tamponunda (pH 5) çözüldü. Üst sıvı ve çökeltilerde ayrı ayrı enzim aktivitesi ve protein miktarı absorpsanları ölçüldü ve bulunan absorpsan değerleri standart grafiklerde yerlerine konarak total ünite ve protein miktarları hesaplandı.

7.2.1 Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Kitinaz Aktivitesi

Üst sıvı ve çökeltilerdeki kitinaz aktivitesi değerleri kıyaslandığında aktivite kayıpları gözlemlendi (Şekil 7.2.1 ve Şekil 7.2.2). % 80 amonyum sülfat doygunluğunda üst sıvıda enzim aktivitesi bulunmadı ve karşılık gelen çökeltideki enzim aktivitesinin en yüksek olması beklenirken, %60 amonyum sülfat doygunluğundaki çökelti enzim aktivitesi ile karşılaştırıldığında daha az bir aktivite değeri gözlemlendi.

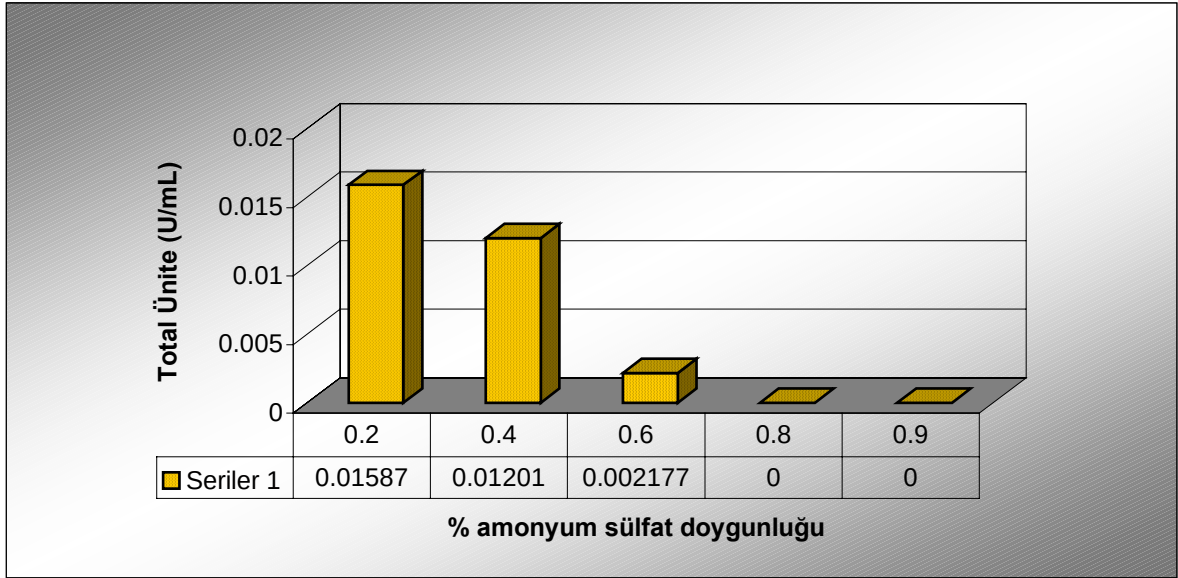
7.2.2 Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Protein Miktarı

Üst sıvı ve çökeltilerdeki protein miktarları kıyaslandığında ise % 80 amonyum sülfat doygunluğundan sonra üst sıvıdaki protein miktarının azaldığı gözlemlendi (Şekil 7.2.3). Çökeltide ise %90 amonyum sülfat doygunluğunda en yüksek protein miktarı belirlendi (Şekil 7.2.4).

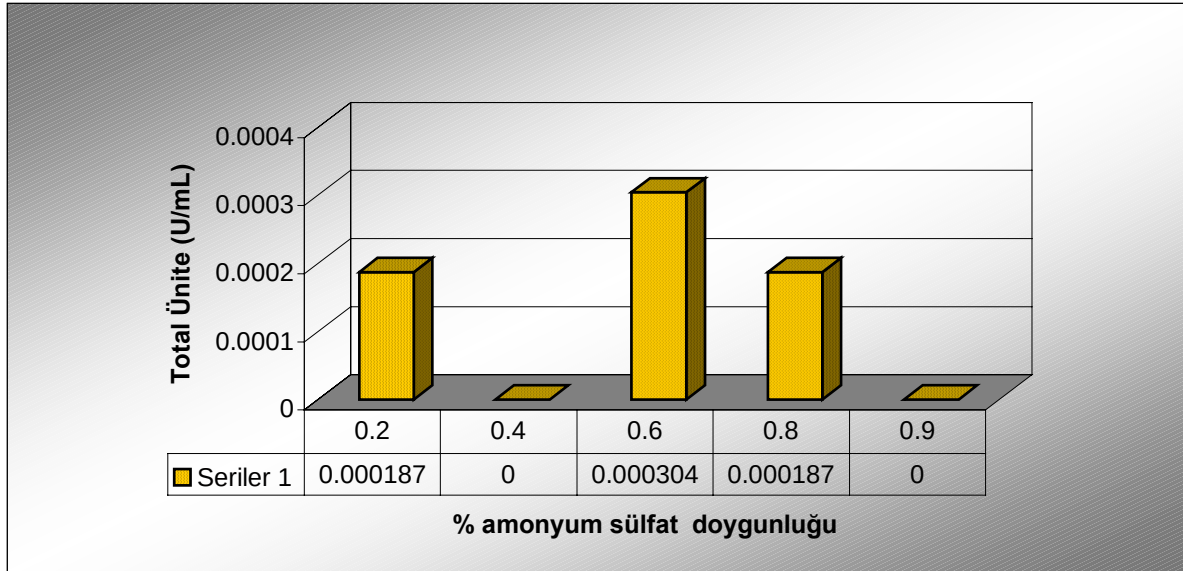
7.2.3 Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Spesifik Kitinaz Aktivitesi

Üst sıvılardaki spesifik aktivite değerleri ile kıyaslandığında çökeltilerde, önemli ölçüde aktivite kaybı gözlemlense de kitinaz enziminin spesifik aktivitesinin % 60 amonyum sülfat doygunluğunda en yüksek olduğu bulundu. Buna karşılık % 60 amonyum sülfat doygunluğunda üst sıvıda az miktarda da olsa bir spesifik aktivite gözlemlendi (Şekil 7.2.5 ve Şekil 7.2.6).

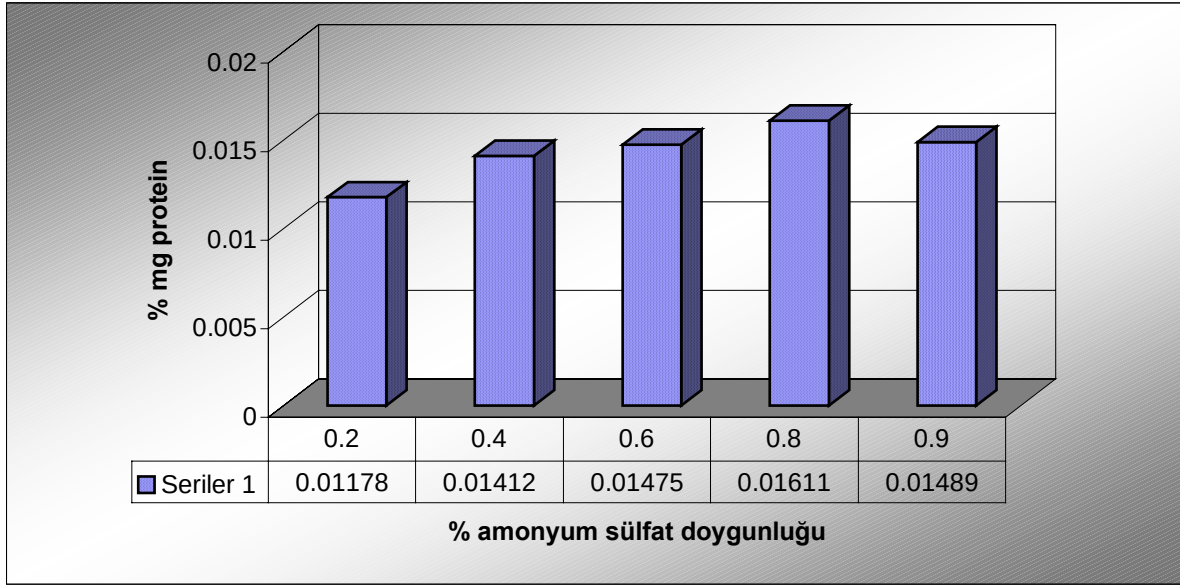
Bu sonuçlar üzerine %60 ve %80 arasındaki amonyum sülfat doygunlukları için aktivite ve protein miktarlarının bilinmesinin daha net sonuçlar vereceği düşünülerek kademeli amonyum sülfat yönteminin uygulanmasına karar verildi.



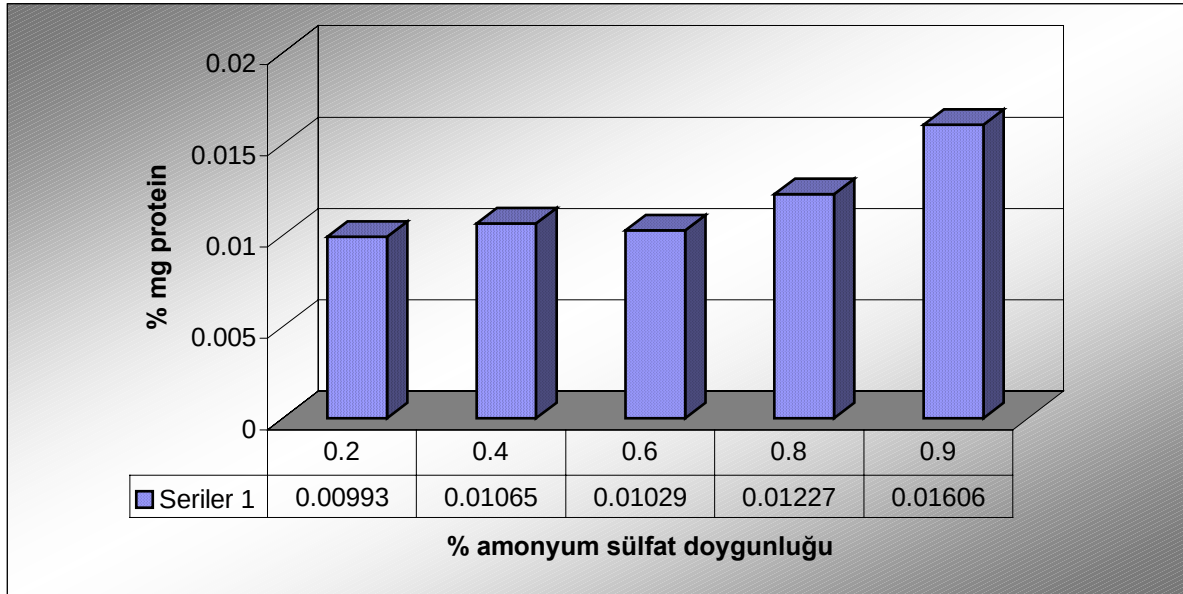
Şekil 7.2.1 Farklı amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürmeler sonrası üst sıvılarda saptanan kitinaz aktivitesi



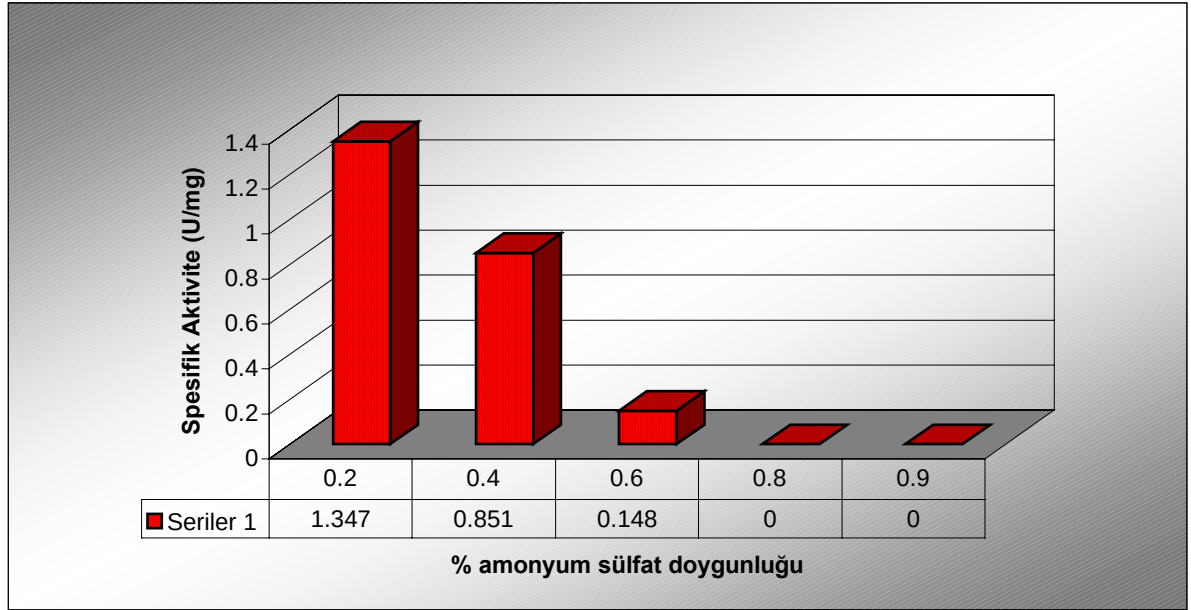
Şekil 7.2.2 Farklı amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürmeler sonrası çökeltilerde saptanan kitinaz aktivitesi



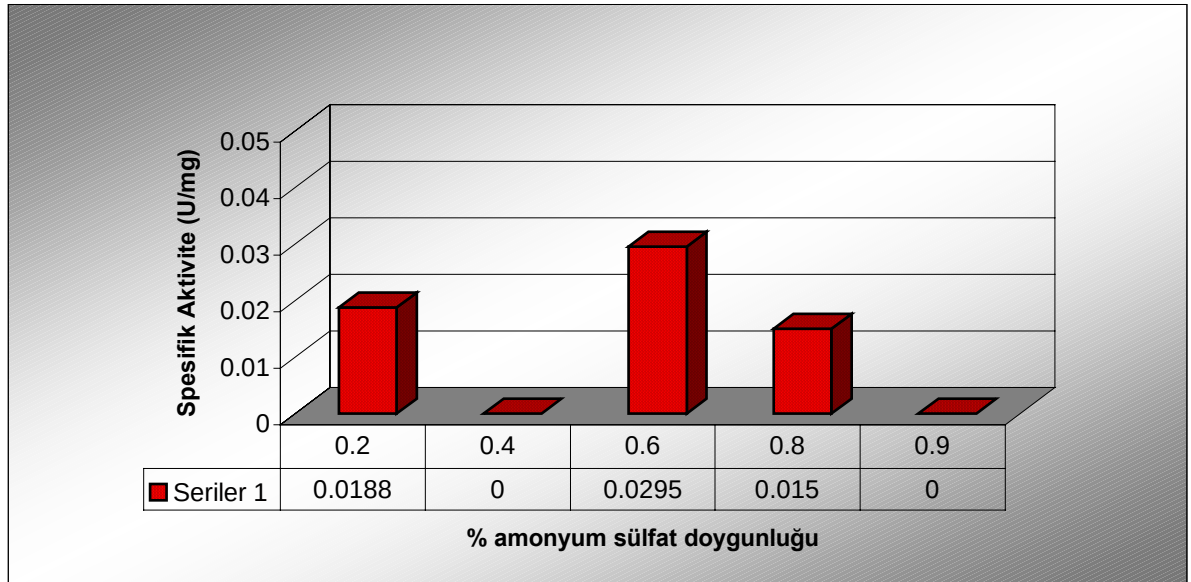
Şekil 7.2.3 Farklı amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürmeler sonucu üst sıvılardaki protein miktarları



Şekil 7.2.4 Farklı amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürmeler sonucu çöktürmelerdeki protein miktarları



Şekil 7.2.5 Farklı amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürmeler sonucu üst sıvıdaki kitinaz enziminin spesifik aktivitesi



Şekil 7.2.6 Farklı amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürmeler sonucu çökeltideki kitinaz enziminin spesifik aktivitesi

7.3 Kademeli Amonyum Sülfat Çöktürmesinin Enzim Aktivitesi ve Protein Miktarına Etkisi

İlk yöntemdeki aktivite kayıpları ardından kademeli amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi uygulandı. 6.6.2’de anlatıldığı gibi ikinci yöntemde; ham filtrattaki başlangıç amonyum sülfat doygunluğu %20 olacak şekilde belirlendi. Çöktürme işleminden sonra üst sıvı ve çökeltide kitinaz aktivitesi ve protein miktarı tayini yapıldı. Bu işlemlere amonyum sülfatın sıvı kısımdaki konsantrasyonu, kademeli olarak her defasında %10 arttırılmak suretiyle, %90’a kadar çıkarılarak ve her defasında sözü edilen enzim aktivitesi ve protein miktar tayinleri yapılarak devam edildi.

7.3.1 Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Kitinaz Aktivitesi

İlk kitinaz aktivitesi %30 amonyum sülfat içeren ham filtratın santrifüjü ile elde edilen çökeltide saptandı. Üst sıvıdaki kitinaz aktivitelerine bakıldığında ise %80 amonyum sülfat içeren ham filtratta ilk kez aktivite gözlenmezken aynı doygunlukta çökeltide de aktivite bulunmadı. %90 amonyum sülfat doygunluğunda çökeltide aktivitenin bulunması ile %80’lik amonyum sülfat doygunluğunda denatürasyondan dolayı aktivite kaybının olduğu sonucuna varıldı. Dolayısıyla kitinaz enziminin çöktürülmesi için gerekli olan tuz konsantrasyonun üst sınırı %70’lik tuz doygunluğu olarak belirlendi (Şekil 7.3.1 ve Şekil 7.3.2).

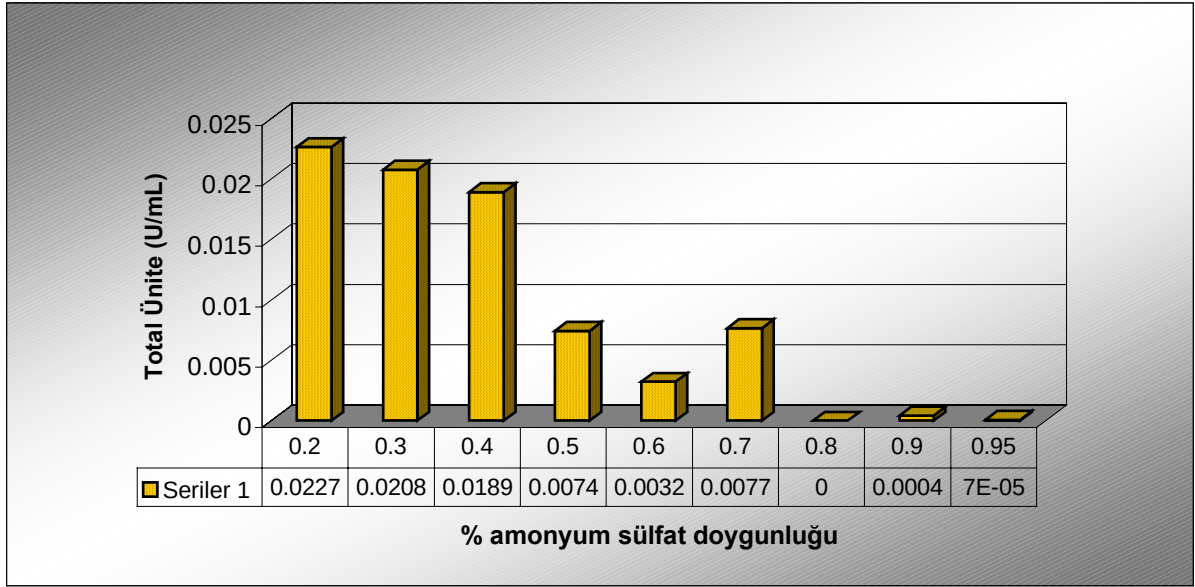
Üst sıvı ve çökeltilerdeki aktivite değerleri sonuçları kıyaslandığında yine çökeltilerde önemli ölçüde aktivite kaybı gözlemlendi.

7.3.2 Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Protein Miktarı

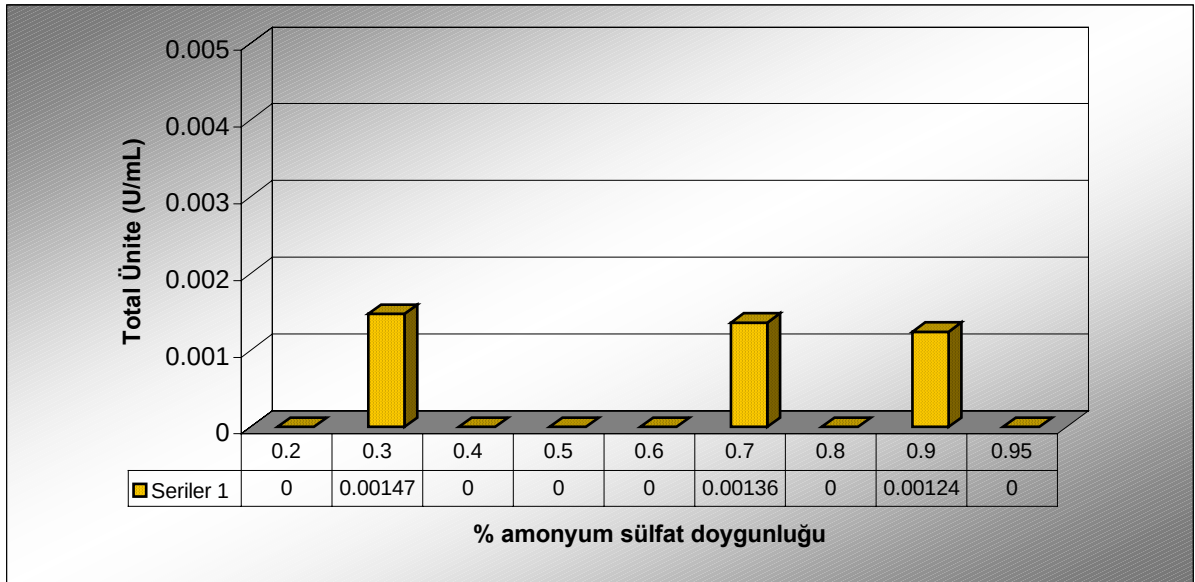
Üst sıvı ve çökeltilerdeki protein miktarları Şekil 7.3.3 ve Şekil 7.3.4’de gösterilmiştir. Üst sıvılardaki protein miktarlarına bakıldığında en yüksek protein miktarı %80 amonyum sülfat doygunluğunda bulundu. Buna karşılık çökeltilerdeki protein miktarları incelendiğinde %95 amonyum sülfat doygunluğundaki çökeltide en yüksek olduğu saptandı.

7.3.3 Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Spesifik Kitinaz Aktivitesi

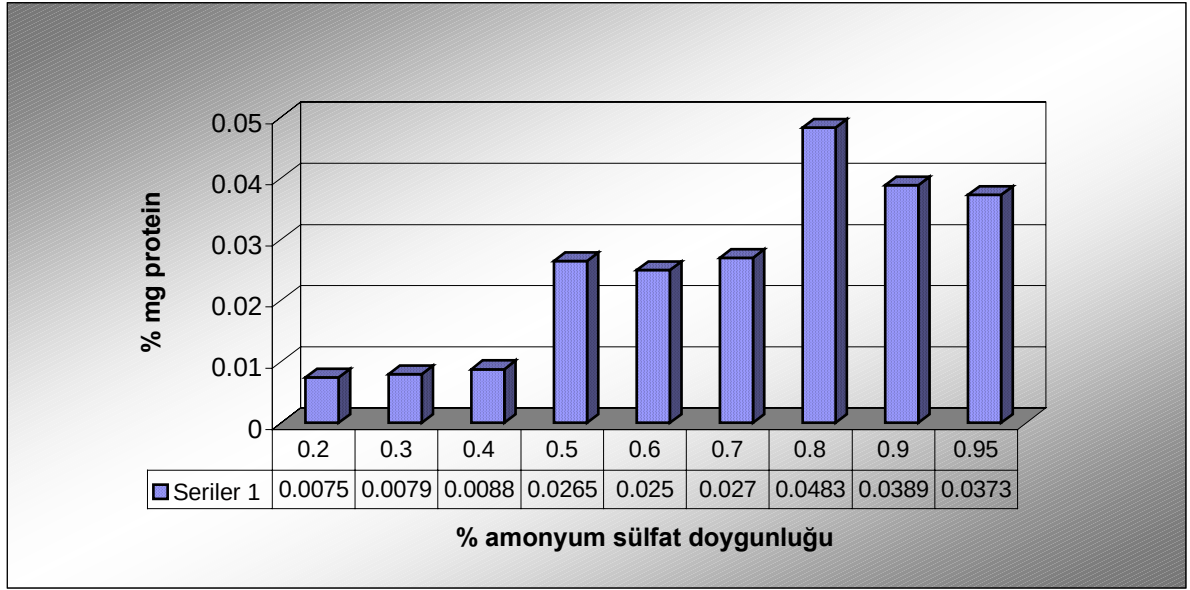
Çökeltilerdeki kitinaz enziminin spesifik aktivite değerlerinin üst sıvılardaki değerleriyle kıyaslandığında yaklaşık 10 kez azaldığı bununla birlikte çökeltilerde bulunan en yüksek enzim spesifik aktivitesinin %90’lık tuz doygunluğunda olduğu bulundu (Şekil 7.3.5 ve Şekil 7.3.6).



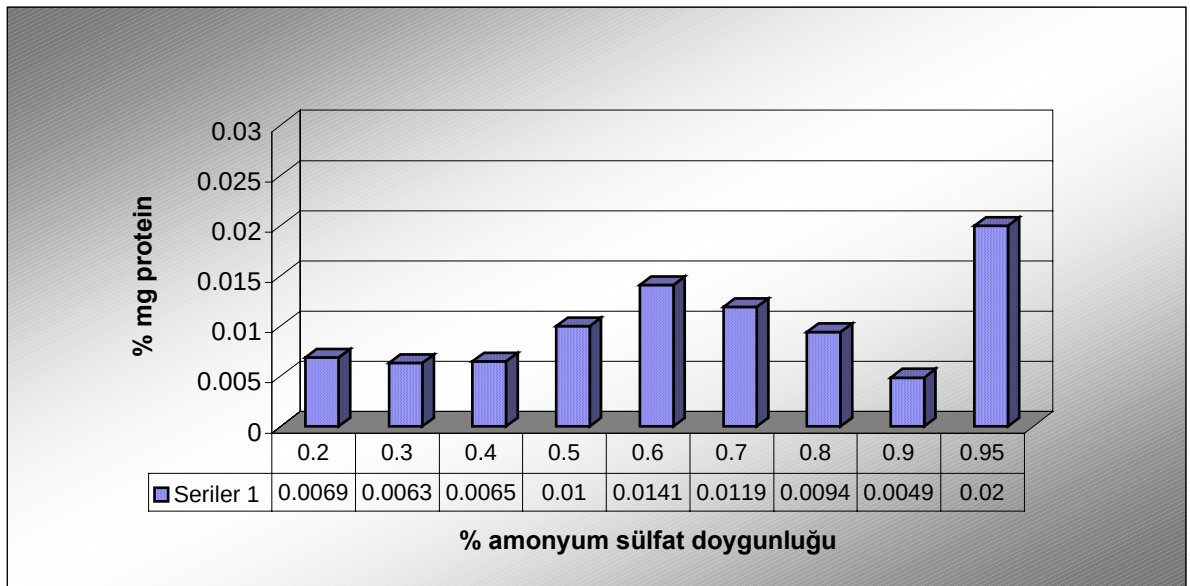
Şekil 7.3.1 Kademeli amonyum sülfat çöktürmesinin üst sıvıdaki kitinaz aktivitesine etkisi



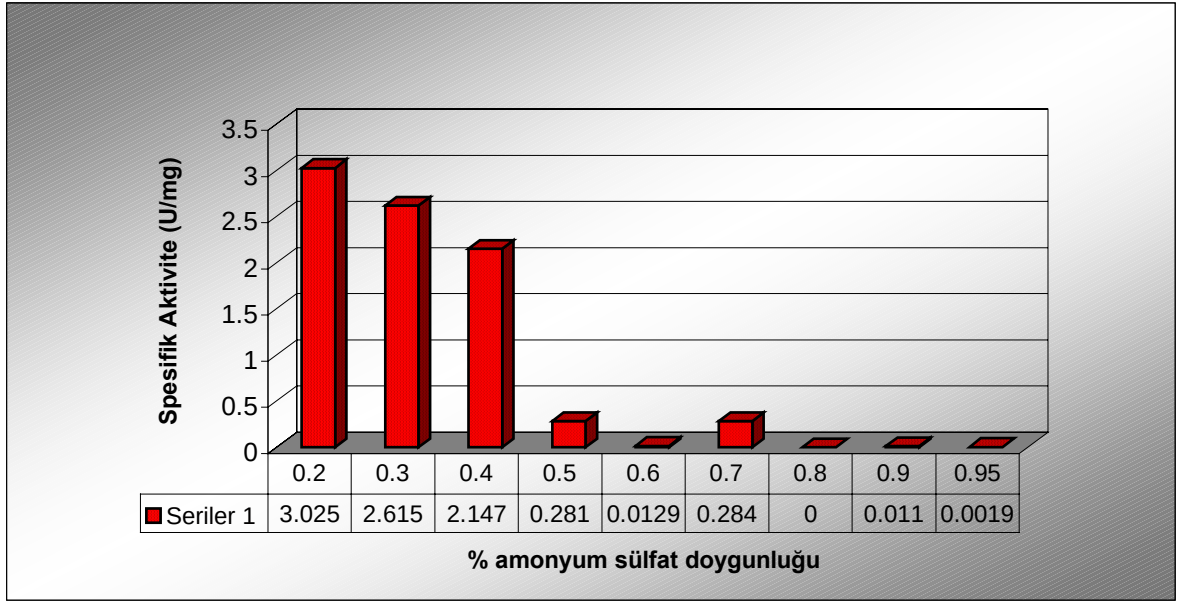
Şekil 7.3.2 Kademeli amonyum sülfat çöktürmesinin çökeltideki kitinaz aktivitesine etkisi



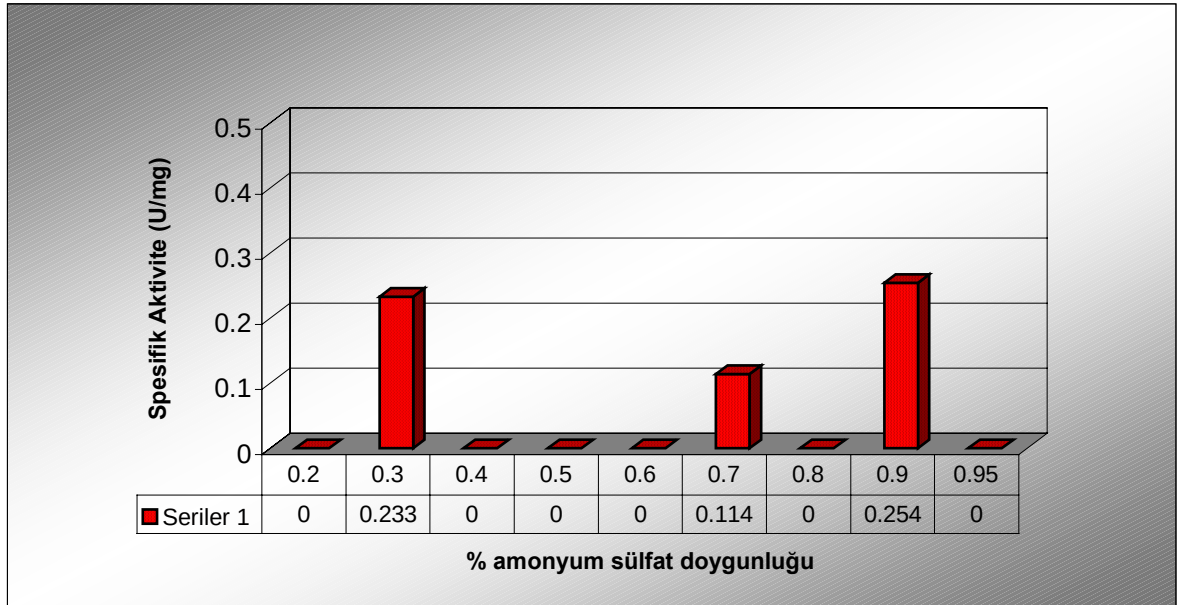
Şekil 7.3.3 Kademeli amonyum sülfat çöktürmesinin üst sıvıdaki protein miktarına etkisi



Şekil 7.3.4 Kademeli amonyum sülfat çöktürmesinin çökeltideki protein miktarına etkisi



Şekil 7.3.5 Kademeli amonyum sülfat çöktürmesinin üst sıvıdaki kitinaz enziminin spesifik aktivitesine etkisi



Şekil 7.3.6 Kademeli amonyum sülfat çöktürmesinin çökeltideki kitinaz enziminin spesifik aktivitesine etkisi

7.4 Organik Çözücülerle Çöktürme

6.6.3'te anlatıldığı gibi iki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol ve aseton çöktürmeleri sonucu üst sıvı ve çökeltilerde enzim aktivitesi ve protein miktarı karşılaştırmalı olarak incelendi.

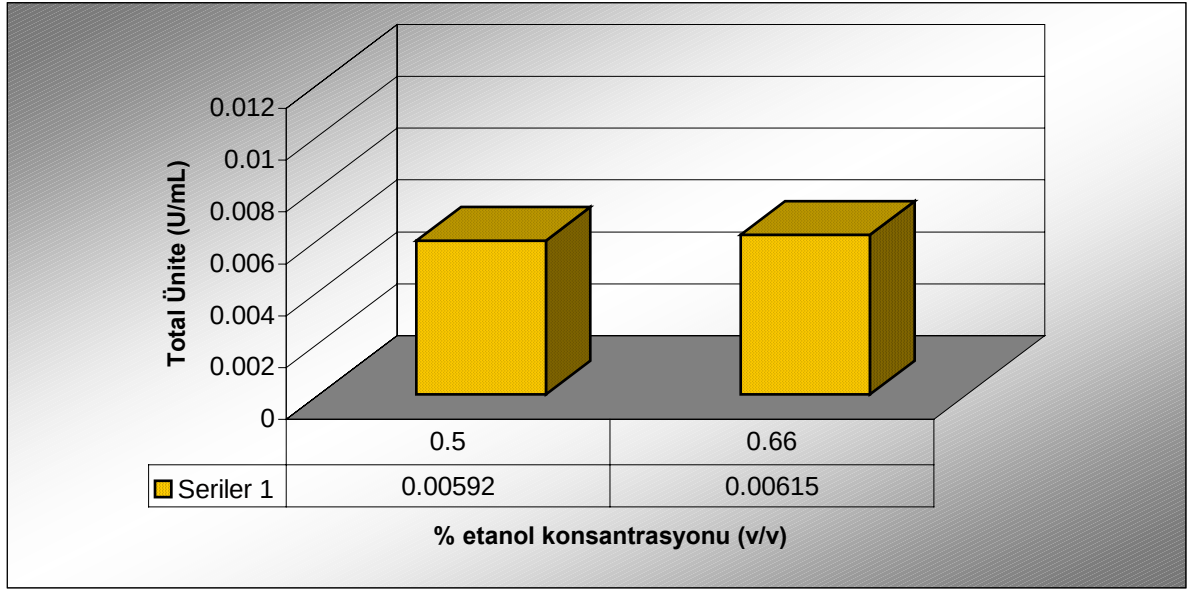
7.4.1 Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Kitinaz Aktivitesi

%50 (v/v) ve %66 (v/v) olarak uygulanan etanol çöktürmesinde üst sıvılarda enzim aktivitesinde önemli bir fark gözlenmedi (Şekil 7.4.1). Aseton çöktürmesi uygulanan ham filtratın üst sıvılarında ise %50 (v/v) konsantrasyondaki çöktürmede %66 (v/v) konsantrasyondakine göre daha fazla enzim aktivitesi saptandı (Şekil 7.4.2).

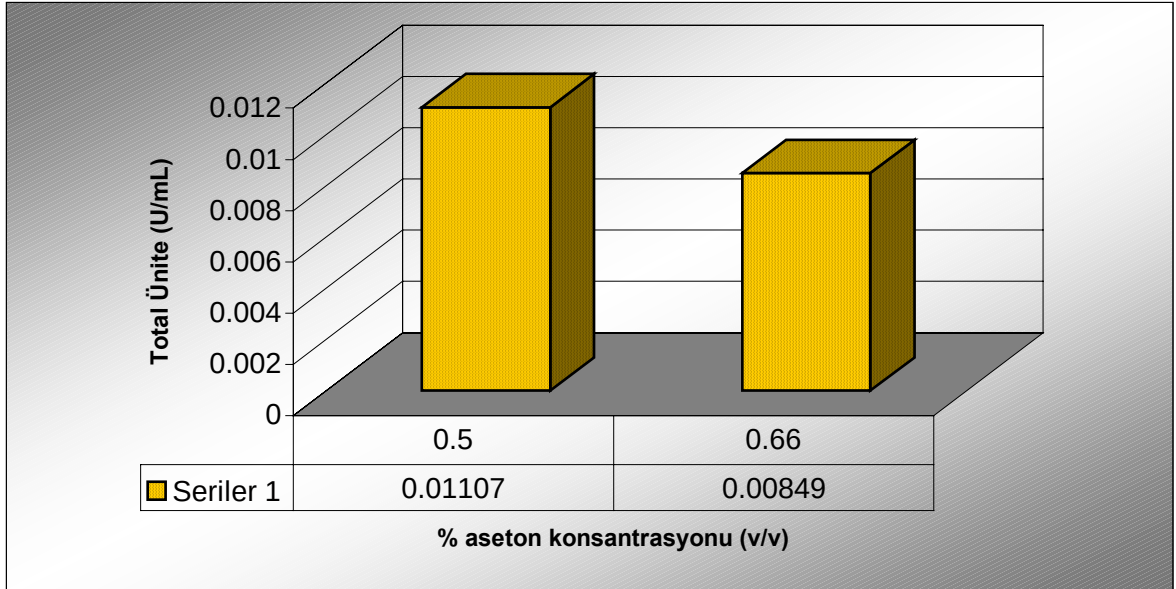
Çökeltilerdeki kitinaz aktivitesi kıyaslandığında ise etanol konsantrasyonları için yine benzer sonuçlar saptanırken aseton konsantrasyonları arasında %66 (v/v)'de daha yüksek enzim aktivitesi bulundu (Şekil 7.4.3 ve Şekil 7.4.4). Asetonun etanole göre kitinaz enziminin çöktürülmesinde daha uygun olduğu sonucuna varıldı. Bununla birlikte her iki organik çözücünün de ham filtrattaki kitinaz aktivitesi (Şekil 7.1.1) baz alındığında çöktürme sonucunda ortalama %50 oranında aktivite kayıplarına sebep olduğu saptandı.

7.4.2 Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Protein Miktarı

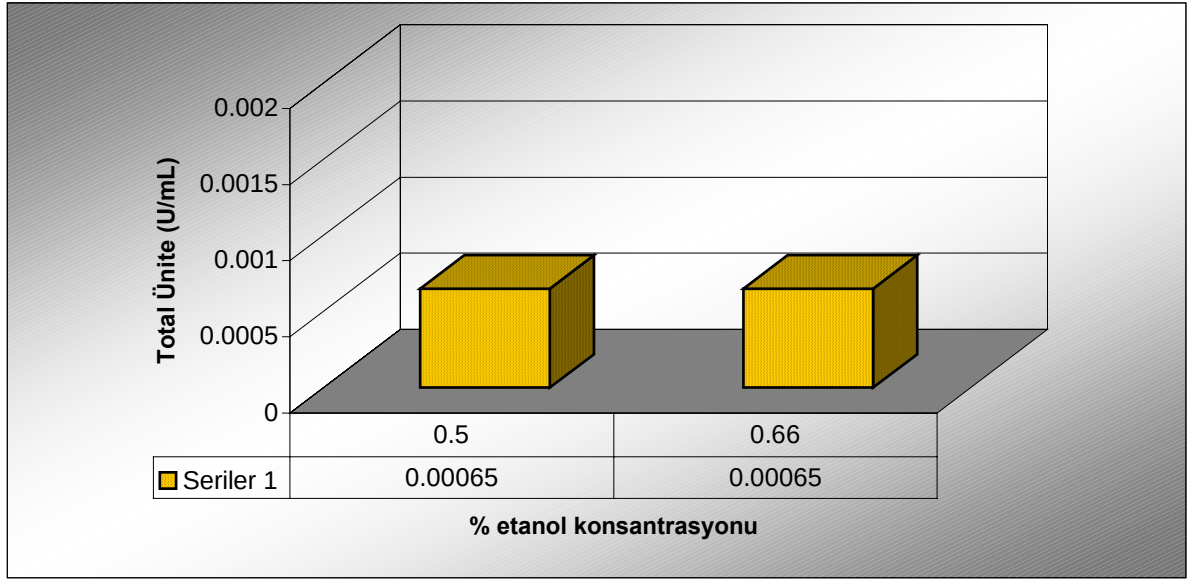
Protein miktarlarına bakıldığında ise; her iki organik çözücü ve bunların farklı konsantrasyonları için üst sıvılarda ve çökeltilerdeki protein miktarlarında benzer sonuçlar saptandı (Şekil 7.4.5, Şekil 7.4.6, Şekil 7.4.7 ve Şekil 7.4.8). Ham filtrattaki protein miktarı (Şekil 7.1.2) ile karşılaştırıldıklarında ise her iki organik çözücünün de protein miktarı üzerinde olumsuz etkisi olmadığı gözlemlendi.



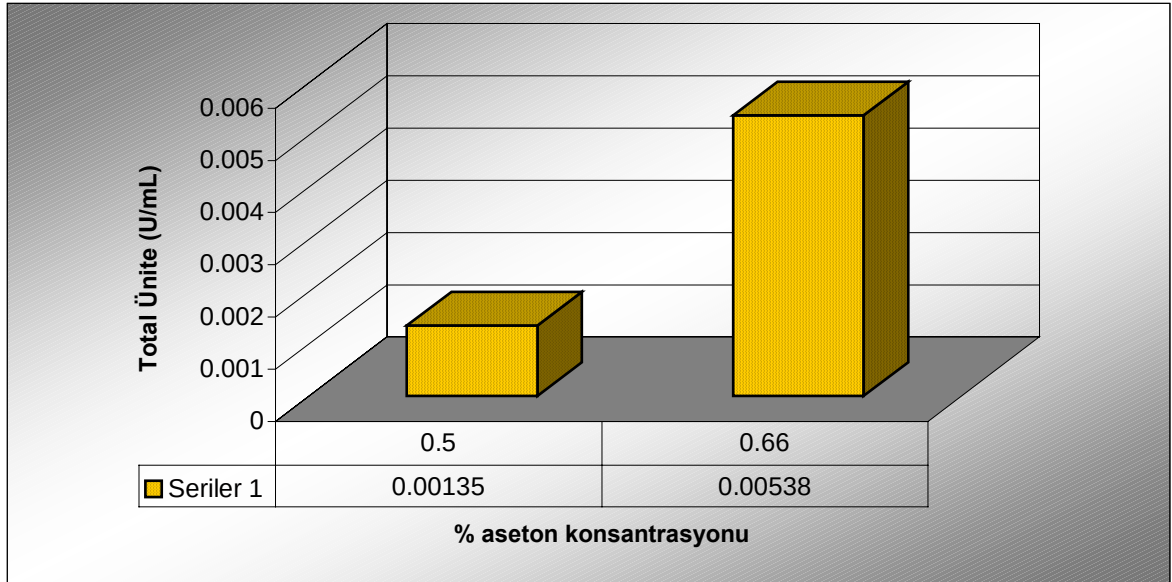
Şekil 7.4.1 İki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol çöktürmenin üst sıvıdaki kitinaz aktivitesine etkisi



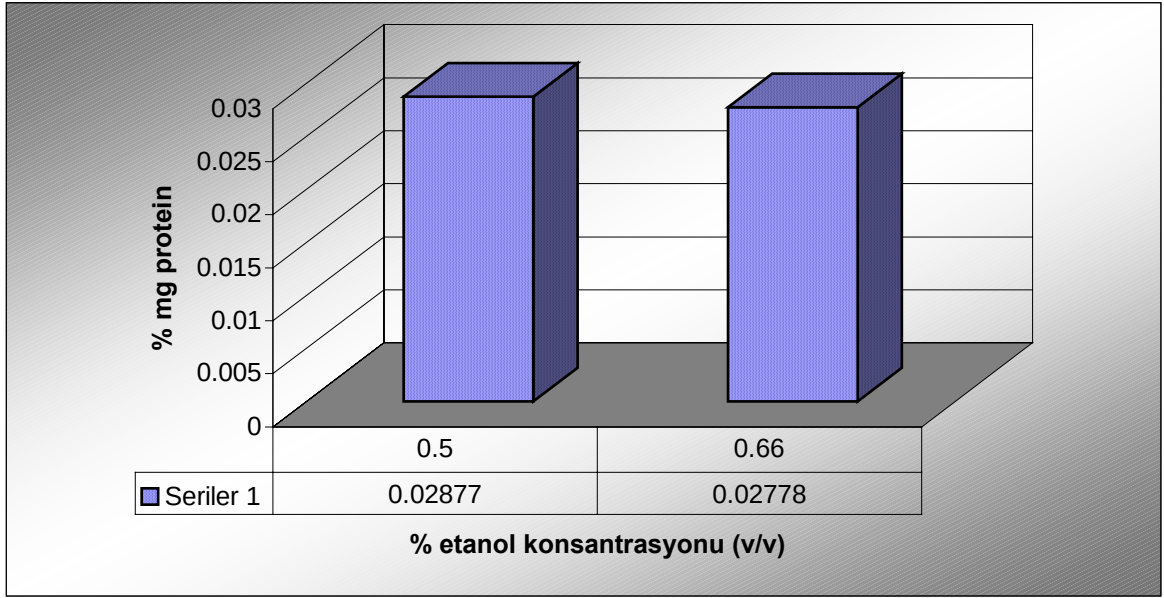
Şekil 7.4.2 İki farklı konsantrasyonda uygulanan aseton çöktürmesinin üst sıvıdaki kitinaz aktivitesine etkisi



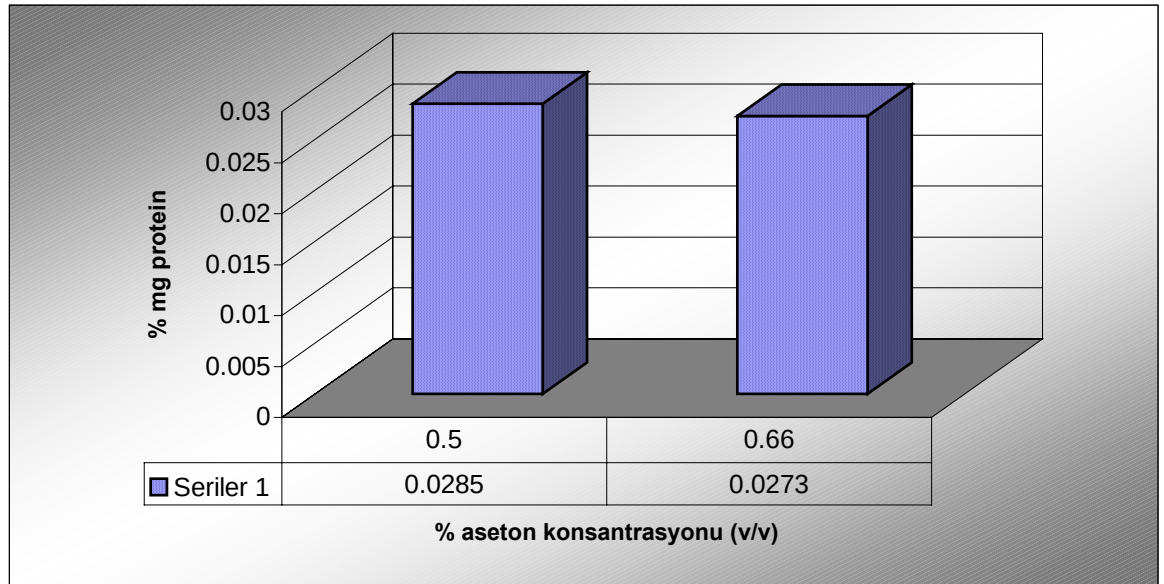
Şekil 7.4.3 İki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol çöktürmesinin çökeltideki kitinaz aktivitesine etkisi



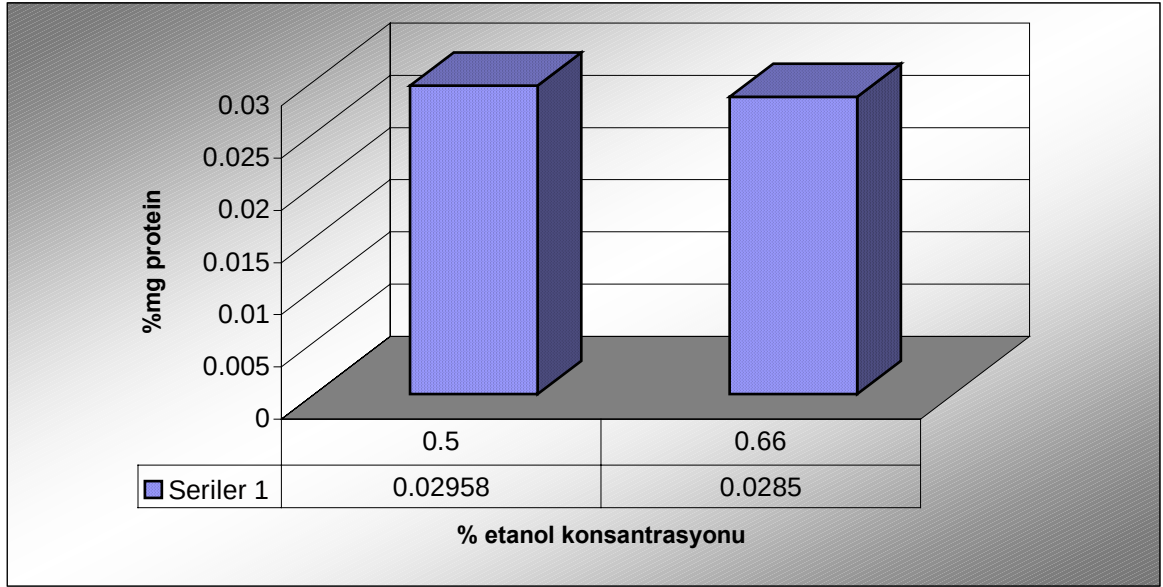
Şekil 7.4.4 İki farklı konsantrasyonda uygulanan aseton çöktürmesinin çökeltideki kitinaz aktivitesine etkisi



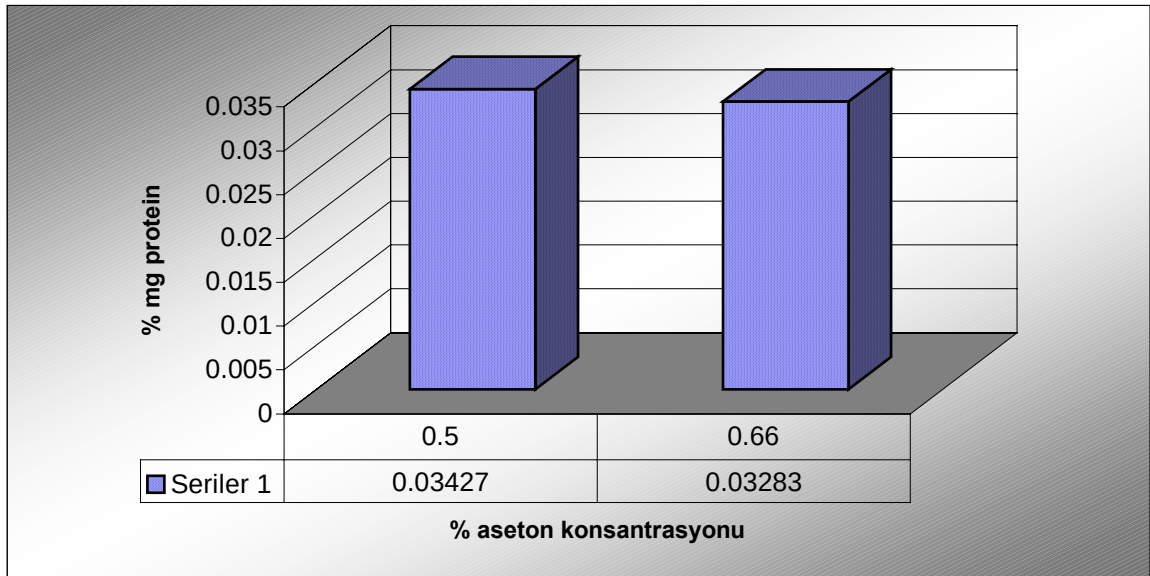
Şekil 7.4.5 İki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol çöktürmesinin üst sıvıdaki protein miktarına etkisi



Şekil 7.4.6 İki farklı konsantrasyonda uygulanan aseton çöktürmesinin üst sıvıdaki protein miktarına etkisi



Şekil 7.4.7 İki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol çöktürmesinin çökeltideki protein miktarına etkisi



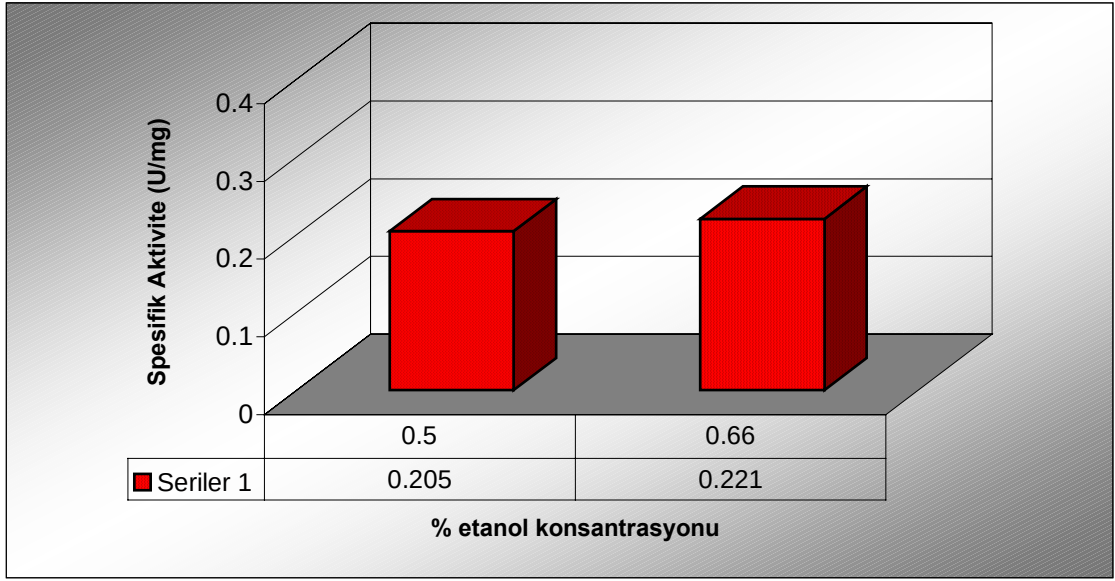
Şekil 7.4.8 İki farklı konsantrasyonda uygulanan aseton çöktürmesinin çökeltideki protein miktarına etkisi

7.4.3 Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Spesifik Kitinaz Aktivitesi

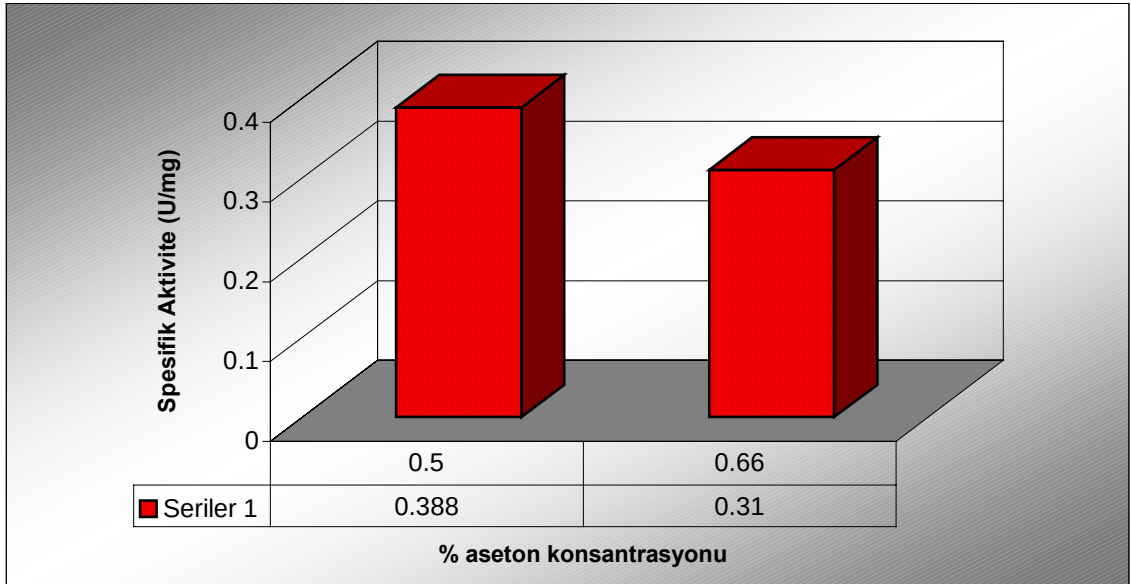
Üst sıvı ve çökeltilerde etanol ve asetonun iki farklı konsantrasyonun spesifik kitinaz aktivitesine etkisine bakıldığında, ham filtrattaki spesifik kitinaz aktivitesine (şekil 7.1.3) göre yine aktivasyon kayıplarının olduğu fakat kitinaz enziminin çöktürülmesi için asetonun etanole göre daha uygun olduğu bulundu.

Üst sıvılardaki spesifik kitinaz aktiviteleri kıyaslandığında asetonun %50 konsantrasyonunda daha yüksek olduğu, etanolün %50 ve %66 konsantrasyonlarında ise spesifik kitinaz aktivite değerlerinin arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı (Şekil 7.4.9 ve Şekil 7.4.10).

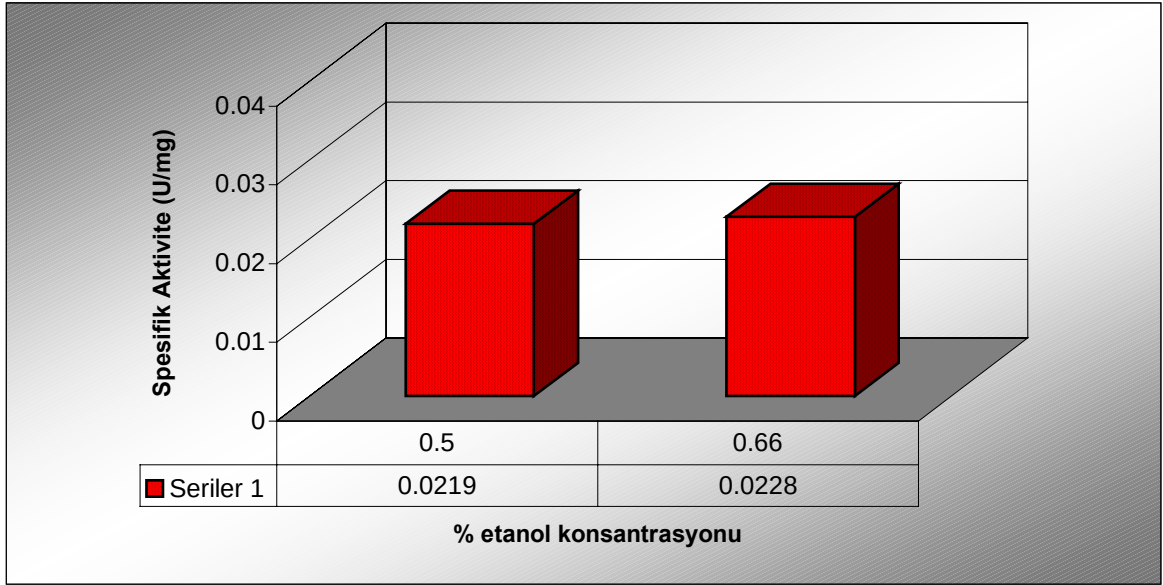
Çökeltilerdeki spesifik kitinaz aktivite değerleri karşılaştırıldığında ise üst sıvılardakine göre çökeltilerde aktivite kayıplarının olmasına rağmen, asetonun %50 konsantrasyonunda daha yüksek spesifik kitinaz aktivitesi bulundu (Şekil 7.4.11 ve Şekil 7.4.12).



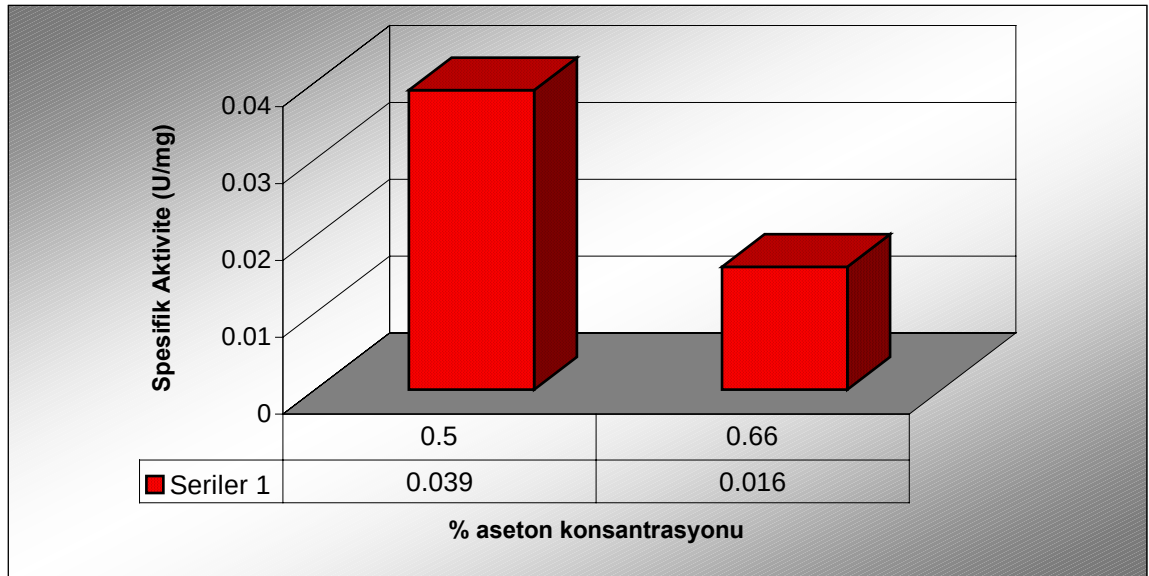
Şekil 7.4.9 İki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol çöktürmesinin üst sıvıdaki kitinaz enziminin spesifik aktivitesine etkisi



Şekil 7.4.10 İki farklı konsantrasyonda uygulanan aseton çöktürmesinin üst sıvıdaki kitinaz enziminin spesifik aktivitesine etkisi



Şekil 7.4.11 İki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol çöktürmesinin çökeltideki kitinaz enziminin spesifik aktivitesine etkisi



Şekil 7.4.12 İki farklı konsantrasyonda uygulanan aseton çöktürmesinin çökeltideki kitinaz enziminin spesifik aktivitesine etkisi

7.5 TCA Çöktürmesi

Üst sıvı ve çökeltilerdeki protein miktarlarını ve aktivite kayıpları göz önüne alınarak TCA çöktürmesinin protein denatürasyonuna ve enzim aktivitesine etkisinin incelenmesine karar verildi. Bu çöktürme yönteminde nicel protein miktarının ölçülmesi esas alındı.

7.5.1 Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Kitinaz Aktivitesi

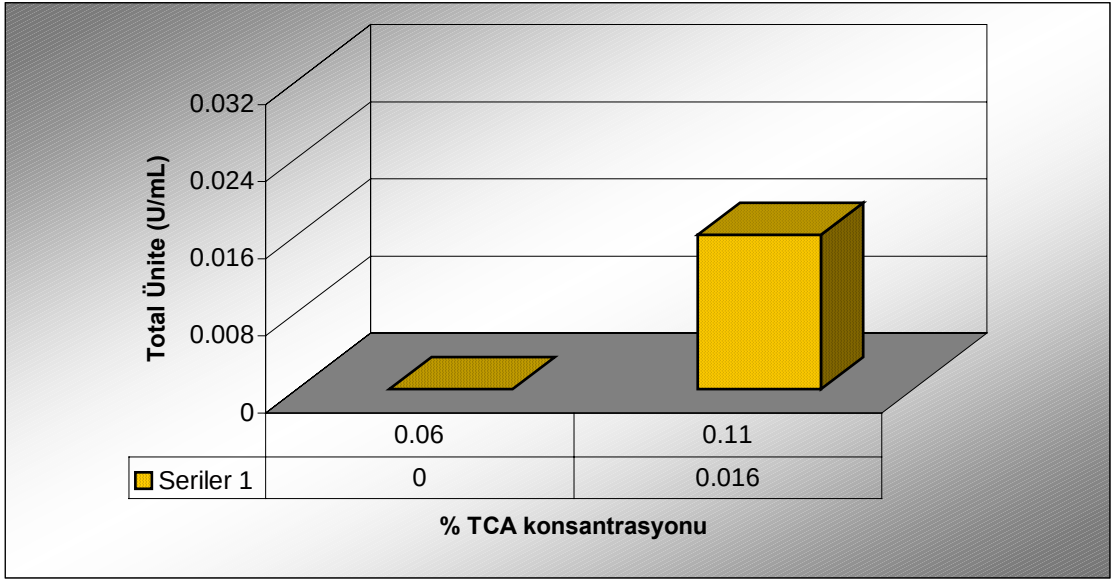
% 6 ve % 11 olarak uygulanan TCA çöktürmesi sonucunda üst sıvılarda enzim aktivitesi saptanmadı. Çökeltilerde TCA konsantrasyonunun artmasıyla beraber kitinaz aktivitesi değerlerinde az da olsa artış görüldü (Şekil 7.5.1). TCA'nın proteinleri denatüre ederek çöktürdüğü bilindiği halde çökeltide enzim aktivitesi saptandı.

7.5.2 Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Protein Miktarları

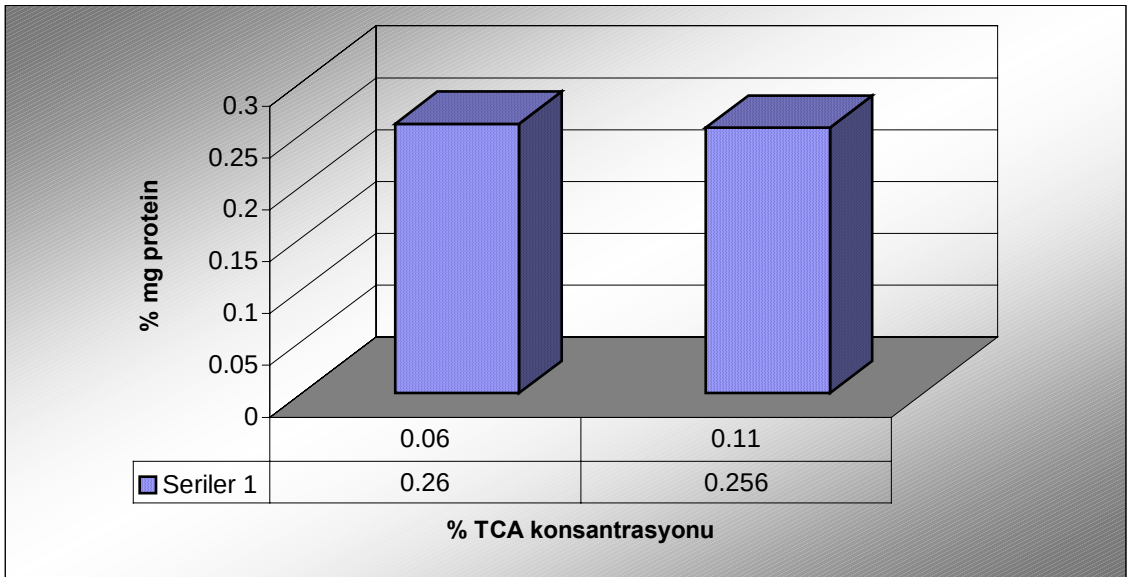
İki farklı konsantrasyonda uygulanan TCA çöktürmesi sonucunda üst sıvıda proteine rastlanmadı. Buna karşılık çok az miktardaki çökeltiler incelendiğinde, TCA konsantrasyonun protein miktarlarında önemli bir farka sebep olmadığı bulundu (Şekil 7.5.2).

7.5.3 Üst Sıvı ve Çökeltilerdeki Spesifik Kitinaz Aktivitesi

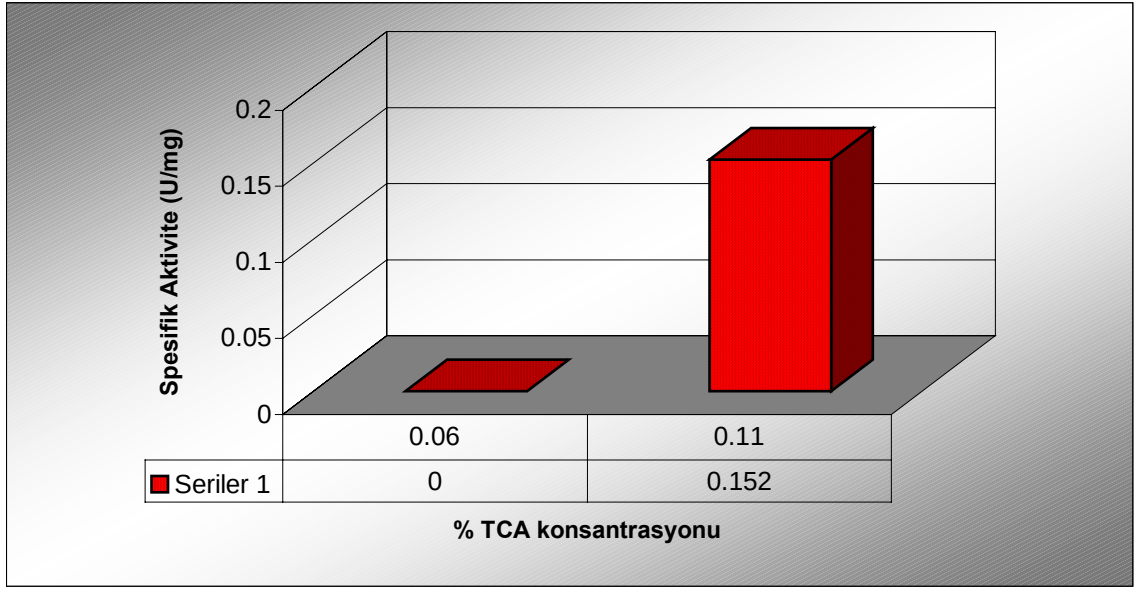
Üst sıvılarda protein ve enzim aktivitesine rastlanmadığından dolayı spesifik kitinaz aktivitesi de tanımlanmadı. Çökeltilerde ise % 11 konsantrasyonunda uygulanan TCA çöktürmesinde spesifik kitinaz aktivitesi 0.152 U/mg olarak bulundu (Şekil 7.5.3).



Şekil 7.5.1 İki farklı konsantrasyonda uygulanan TCA çöktürmesinin çökeltideki kitinaz aktivitesine etkisi



Şekil 7.5.2 İki farklı konsantrasyonda uygulanan TCA çöktürmesinin çökeltideki protein miktarına etkisi



Şekil 7.5.3 İki farklı konsantrasyonda uygulanan TCA çöktürmesinin çökeltideki spesifik kitinaz aktivitesine etkisi

8. TARTIŞMA

Trichoderma türlerinin bitkiler için patojen olan mantarların kontrolündeki yetenekleri uzun zamandan beri bilinmektedir. Bitkilerin biyolojik kontrolünde kullanılan ve daha sıklıkla çalışılan türler, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* ve *Trichoderma asperellum*'dur (Kubicek ve Harman, 1998). *Trichoderma* türlerinin ürettikleri ve hücre dışına salgıladıkları β -(1,3)-glukanazlar, kitinazlar, lipazlar ve proteazlar patojenik mantarların hücre duvarlarına saldıran enzimlerdir (Haran vd., 1996).

Kitin, N-asetil-D-glukozaminin β -1,4 bağlı, yüksek molekül ağırlıklı, çözünmez, lineer bir homopolimeridir. Doğada selülozdan sonra en çok bulunan polisakkarit olarak bilinir. Mantarların ve alglerin hücre duvarlarının, böceklerin ve eklembacaklıların dış iskeletlerinin molluskların ve deniz omurgasızlarının kabuklarının temel yapısal bileşenidir (Muzzarelli,1977; Gooday and Trinci,1980; Flach, 1992; Deshpande,1999; Tanaka vd., 2003).

Kitinin tam olarak enzimatik hidrolizi sonucu birbirinden bağımsız N-asetilglukozamin (GlcNAc) birimleri oluşur. Bu hidroliz kitinolitik bir sistem tarafından gerçekleştirilir (Deshpande,1986; Gooday vd.,1985; Shaikh,1993). Kitinolitik enzimlerden biri olan kitinazlar [E.C.3.2.1.14] bitki ve omurgalıların savunma mekanizmalarında da görevlidirler. (Gooday, 1995).

Kitinolitik enzimler; bitki patojeni olan mantar ve böceklerin biyokontrolünde, gıda ve yem endüstrisinde, insan sağlığı ve ilaç endüstrisinde, tek hücre proteini üretiminde ve özellikle kitin bakımından zengin atık materyallerin parçalanmasında önemli bir role sahiptirler (Patil vd., 2000).

Trichoderma atroviride (ATCC 74058) soyu *Trichoderma harzianum* P1 olarak da bilinen toprak kökenli, filamentli bir mantardır. En iyi ve en çok çalışılmış kitinolitik sistemler *Trichoderma* türleri arasındaki *T. harzianum* ve *T. atroviride*'dekilerdir. *Trichoderma* türleri biyolojik kontrolde başarılıdır. Çünkü parazit patojen mantarlara karşı çeşitli yeteneklere sahiptirler. Örneğin; beslenmeleri için patojenik mantarlar ile dış-rekabetçi olarak yarışır, patojenler için toksik olan bileşikler üretirler ya da ürettikleri enzimler patojenik mantarların hücre duvarlarını parçalar. Bu yetenekleri ile bitkilere, saldırılara karşı başarılı bir savunma imkanı sağlayarak, bitki gelişimi ve direncini arttırabilirler (Harman ve Kubicek, 1998).

Kitinazların, kitin ve türevlerinin günden güne artan geniş uygulama alanlarına sahip olmalarının yanısıra *T. atroviride*'nin bitki biyokontrolündeki başarısını da göz önüne alarak

biyokontrol için yeni yaklaşımlar hedeflemektedir. Bu amaçla *T. atroviride* kitinazını ve farklı uygulama alanlarındaki başarılarını daha iyi aydınlatabilmek için saflaştırma yoluna gitmek istedik. Daha önceki çalışmada *T. atroviride*'den indüklenen kitinazın maksimum aktivitesi için belirlenen optimum koşulları kullandık (Orhan, 2005). Bu koşullarda Dana ve arkadaşlarının önerdiği enzim üretim ortamına (sıvı besiyerine) ek olarak yer değiştirme yöntemi kullanılarak, çalkalamalı ortamda, % 0.1 kolloidal kitin içeren ve sakkaroz ile desteklenmiş sıvı besiyerinde 30 °C'de 48 saat *T. atroviride* kültürünün inkübasyonu ile maksimum kitinaz aktivitesi elde edildi. İnkübasyon sonunda enzim içeren sıvı besiyerindeki *T. atroviride* miselleri süzüldü. Süzüntü 5000 devir/dakika'da 30 dakika santrifüj edilerek çökelti ve üst sıvı ayrıldı. Santrifüj işlemi sonunda çökelti atıldı ve üst sıvı ham filtrat olarak adlandırıldı. Çöktürme işleminin uygulanacağı ham filtratta enzim aktivitesi ve protein miktar tayini yapıldı. Spesifik kitinaz aktivitesi 2.339 U/mg olarak bulundu (Şekil 7.1.3).

Amonyum sülfat çöktürmesi iki farklı yöntem ile uygulandı (6.6.2). İlk yöntemde üst sıvı ve çöktürmelerdeki kitinaz aktivitesi değerleri kıyaslandığında aktivite kayıpları gözlemlendi (Şekil 7.2.1 ve Şekil 7.2.2). % 80 amonyum sülfat doygunluğunda üst sıvıda enzim aktivitesi bulunmadı ve karşılık gelen çöktürme'deki enzim aktivitesinin en yüksek olması beklenirken, %60 amonyum sülfat doygunluğundaki çöktürme enzim aktivitesi ile karşılaştırıldığında daha az bir aktivite değeri gözlemlendi. Üst sıvılardaki spesifik aktivite değerleri ile kıyaslandığında çöktürmelerde önemli ölçüde aktivite kaybı gözlemlendi (Şekil 7.2.5 ve Şekil 7.2.6). Bu sonuçlar üzerine %60 ve %80 arasındaki amonyum sülfat doygunlukları için aktivite ve protein miktarlarının bilinmesinin daha net sonuçlar vereceği düşünülerek kademeli amonyum sülfat yönteminin uygulanmasına karar verildi.

İkinci yöntemdeki sonuçlar bakıldığında yine aktivite kayıpları saptandı. İlk kitinaz aktivitesi %30 amonyum sülfat içeren ham filtratın santrifüjü ile elde edilen çöktürme'de saptandı. Üst sıvıdaki kitinaz aktivitelerine bakıldığında ise %80 amonyum sülfat içeren ham filtratta ilk kez aktivite gözlenmezken aynı doygunlukta çöktürme'de de aktivite bulunmadı. %90 amonyum sülfat doygunluğunda çöktürme'de aktivitenin bulunması ile %80'lik amonyum sülfat doygunluğunda denatürasyondan dolayı aktivite kaybının olduğu sonucuna varıldı. Dolayısıyla kitinaz enziminin çöktürülmesi için gerekli olan tuz konsantrasyonunun üst sınırı %70'lik tuz doygunluğu olarak belirlendi (Şekil 7.3.1 ve Şekil 7.3.2). Çöktürmelerdeki maksimum spesifik kitinaz aktivitesi 0.254 U/mg olarak hesaplandı (Şekil 7.3.6).

Aktivite kayıplarının deney sırasındaki hatalardan ve soğutmanın tam olarak sağlanamamasından kaynaklandığı tespit edildi.

6.6.3'te anlatıldığı gibi iki farklı konsantrasyonda uygulanan etanol ve aseton çöktürmeleri sonucu üst sıvı ve çökeltilerde enzim aktivitesi ve protein miktarı karşılaştırmalı olarak incelendi. %50 (v/v) ve %66 (v/v) olarak uygulanan etanol çöktürmesinde üst sıvılarda enzim aktivitesinde önemli bir fark gözlenmedi (Şekil 7.4.1). Aseton çöktürmesi uygulanan ham filtratın üst sıvılarında ise %50 (v/v) konsantrasyondaki çöktürmede %66 (v/v) konsantrasyondakine göre daha fazla enzim aktivitesi saptandı (Şekil 7.4.2). Çökeltilerdeki kitinaz aktivitesi kıyaslandığında ise etanol konsantrasyonları için yine benzer sonuçlar saptanırken aseton konsantrasyonları arasında %66 (v/v)'de daha yüksek enzim aktivitesi bulundu (Şekil 7.4.3 ve Şekil 7.4.4). Bununla birlikte her iki organik çözücünün de ham filtrattaki kitinaz aktivitesi (Şekil 7.1.1) baz alındığında çöktürme sonucunda ortalama %50 oranında aktivite kayıplarına sebep olduğu saptandı.

Üst sıvı ve çökeltilerde etanol ve asetonun iki farklı konsantrasyonun spesifik kitinaz aktivitesine etkisine bakıldığında, ham filtrattaki spesifik kitinaz aktivitesine (Şekil 7.1.3) göre yine aktivasyon kayıplarının olduğu fakat kitinaz enziminin çöktürülmesi için asetonun etanole göre daha uygun olduğu bulundu. Etanol ile çöktürme sonucu çökeltideki maksimum spesifik kitinaz aktivitesi 0.0228 U/mg iken üst sıvıdaki spesifik kitinaz aktivitesi maksimum 0.221 U/mg olarak hesaplandı. Aseton çöktürmesinde ise üst sıvıda 0.388 U/mg olan spesifik kitinaz aktivitesi çökeltide maksimum 0.039 U/mg olarak hesaplandı. Uygulanan organik çözücülerin konsantrasyonlarının kitinaz enzimini çöktürmeye yetmediği sonucuna varıldı.

Tüm bu aktivite kayıpları dikkate alındığında protein miktarının nicel analizi için TCA çöktürmesine karar verildi. TCA'nın az miktardaki iki farklı konsantrasyonunda yapılan çöktürmeler sonrasında üst sıvılarda protein ve enzim aktivitesi saptanmadı. % 6 ve % 11 olarak uygulanan TCA çöktürmesi sonucunda çökeltide TCA konsantrasyonunun artmasıyla beraber kitinaz aktivitesi değerlerinde az da olsa artış görüldü (Şekil 7.5.1). TCA'nın proteinleri denatüre ederek çöktürdüğü bilindiği halde çökeltide enzim aktivitesi saptandı. TCA çöktürmesinde spesifik kitinaz aktivitesi 0.152 U/mg olarak bulundu (Şekil 7.5.3).

Çeşitli çöktürme yöntemlerinin denenmesine rağmen kitinaz enziminin çöktürülmesi ve dolayısıyla saflaştırılması mümkün olamamıştır. Uygulanan her çöktürme yönteminde enzim aktivitesinin kaybolduğu gözlenmiştir. Aktivite kayıplarının nedeni olarak farklı etkenler saptanmıştır. Deneysel çalışmada inkübatör olarak çalkalayıcı su banyosu kullanılmasından dolayı sıcaklık kontrolü tam olarak sağlanamamıştır. Enzim aktivite kaybını en aza indirmek için tüm çöktürme işlemleri soğukta yapılmaya çalışılmış, yaz ve kış sıcaklık farkları da dikkate alındığında, soğutma koşulları aynı standartlarda gerçekleştirilememiştir. Bu gibi

nedenler dahilinde tekrarlanan deneylerin her seferinde aynı neticeler alınamamıştır. Aktivite kayıpları kitinaz enzimini saflaştırma yolundaki diğer aşamalara geçmeye izin vermemiştir.

KAYNAKLAR

- Adams, D.J., (2004), "Fungal cell walls chitinases and glucanases", *Microbiol.*, 150: 2029-2035.
- 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.
- Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T., ve Harman, G.E., (1999), "Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22", *Appl. Env. Microbiol.*, 65: 2926-2933.
- Bradford, M.M., (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding", *Anal. Biochem.*, 72: 248.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., (1991), "Biology of Microorganisms", Prentice Hall, New Jersey.
- Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B ve Silverman, S.J., (1989), "Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Cell Biol.*, 108: 1665-1672.
- Candy, D.J., Kilby, B.A., (1962), "Studies on chitin synthesis in the desert locust", *J. Exp. Biol.*, 39: 129-140.
- Carsolio, C., Gutierrez, A., Jimenez, B., Vanmontagu, M., Herreraestrella, A., (1994), "Characterization of Ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism", *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 91: 10903-10907.
- Cauchie, H.M., (2002), "Chitin production by arthropods in the hydrosphere", *Hydrobiology*, 470: 63-96.
- 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., (1993), "Biotechnology in Plant Disease Control", Wiley-Liss, New York.
- Cho, Y.I., No, H.K., Meyers, S.P., (1998), "Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3839-3843.
- Chung, Y.S., Lee, K.K., Kim, J.M., (1998), "Durable pres and antimicrobial finishing of cotton fabrics with a citric acid and chitosan treatment", *Textile Res. J.*, 68(10): 772-775.
- Cohen, K.R. ve Chet, I., (1998), "The molecular biology of chitin digestion", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9: 270-277.
- Colinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U., Vad, K., (1993), "Plant chitinases", *Plant J.*, 3: 31-40.
- Dana, M.M., Limon, M.C., Mejias, R., Mach, R.L., Benitez, T., Pintor-Toro, J.A., Kubicek, C.P., (2001), "Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum*", *Curr. Genet.*, 38: 335-342.

- Deshpande, M.V., (1986), "Enzymatic degradation of chitin and its biological applications", J. Sci. Ind. Res., 45(6): 273-281.
- Draborg, H., Kauppinen, S., Dalboge, H., Christgau, S., (1995), "Molecular cloning and expression in *S. Cerevisiae* of two exochitinases from *Trichoderma harzianum*", Biochem. Mol. Biol. Int., 36: 781-791.
- Escott, G.M., Walters, C.E., Ingham, E., Adams, D.J., (1996), "Expression of chitinase activity during monocyte differentiation. In: Muzzarelli R.A.A., editor. Chitin Enzymology", Vol.2. Grottammare: Eur. Chitin Soc., p. 11-20.
- Fischer, E.H. ve Stein, E.A., (1960), "Cleavage of O- and S-glycosidic bonds (survey), in Boyer, P.D., Lardy, H. And Myrbäck, K., (Eds.), The Enzymes, 2nd edn., vol.4", Academic Press, New York, p. 301-312.
- Flach, J., Pilet, P.E., Jolles, P., (1992), "What's new in chitinase research?", Experientia, 48: 701-716.
- Garcia, I., Lora, J.M., Delacruz, J., Benitez, T., Llobell, A., Pintortoro, J.A., (1994), "Cloning and characterization of a chitinase (Chi42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*", Curr. Genet., 27: 83-89.
- Gardner, K.H. ve Blackwell, J., (1975), "Refinement of structure of beta-chitin", Biopolymers, 14(8): 1581-1595.
- Gergopapadakou, N. ve Tkacz, J., (1995), "The fungal cell wall as a drug target", Trends Microbiol., 3: 98-104.
- Gooday, G.W. ve Trinci, A.P.J., (1980), "Wall structure and biosynthesis in fungi. In: Gooday, G.W., Lloyd, D. And Trinci, A.P.J., editors, The Eukaryotic Microbial Cell, p.207-251." Soc. General Microbiol., Cambridge.
- Gooday, G.W., Woodman, J., Casson, E.A., Browne, C.A., (1985), "Effect of nikkomycin on chitin spine formation in the diatom *Thalassiosira fluviatilis*, and observations on its peptide uptake", FEMS Microbiol. Lett., 28:335-40.
- Gooday G.W., Wei-Yun, Z., ve O'Donnell, R.W., (1992), "What are the roles of chitinases in the growing fungus?", FEMS Microbiol. Lett., 100: 387-392.
- Gooday G.W., (1994), " Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan, In: C. Ratledge editor. Biochemistry and microbial degradation", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 279-312.
- Gooday G.W., (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.
- Haran, S., Schickler, H., ve Chet, I., (1996), "Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*", Microbiol., 142: 2321-2331.
- Harman, G.E. ve Kubicek, C.P., (1998), "*Trichoderma and Gliocladium*, Vol.2, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications.", Taylor & Francis, London.
- Harman, G.E., (2000), "The myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderms harzianum* strain T-22", Plant Disease, 84(4): 377-393.

- Hawksworth, D.L., (1991), "The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation", *Mycological Res.*, 95: 641-655.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. ve Pegler, D.N., (1995), "Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi", CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Hayes, C.K., Klemsdal, S., Lorito, M., Dipietro, A., Peterbauer, C., Nakas, J.P., Tronsmo, A., Harman, G.E., (1994), "Isolation and sequence of an endochitinase-encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*", *Gene*, 138: 143-148.
- Henrissat, B., (1991), "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities", *Biochem. J.*, 280: 309-316.
- Henrisat, B., ve Bairoch, A., (1993), "New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities", *Biochem. J.*, 280: 309-316.
- Hirano, S., (1996), "Chitin biotechnological applications. In: Raafat El-Gewely, M., editor", *Biotechnological Annual Review*, Vol.2., Elsevier Press.
- Hoell, I.A., Klemsdal, S.S., Vaaje-Kolstad, G., Horn, S.J., Eijsink, V.G.H., (2005), "Overexpression and characterization of a novel chitinase from *Trichoderma atroviride* strain P1", *Biochem. Biophys. Acta*, 1748: 180-190.
- Horn, S.J. ve Eijsink, V.G.H., (2004), "A reliable reducing end assay for chito-oligosaccharides", *Carbohydr. Polym.*, 56: 35-39.
- Iseli, B., Boller, T., 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.
- Jolles, P., ve Joles, J., (1984), "Whats new in lysozyme research- always a model system, today as yesterday", *Molec. Cell. Biochem.*, 63(2): 165-189.
- Keyhani, N.O. ve Roseman, S., (1997), "Wild-type *Escherichia coli* grows on the chitin disaccharide, N,N'-diacetylchitobiose, by expressing the cell operon", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94(26): 14367-14371.
- Keyhani, N.O., Wang, L.X., Lee, Y.C., ve Roseman, S., (2000), "The chitin disaccharide, N,N'-diacetylchitobiose, is catabolized by *Escherichia coli* and is transported/phosphorylated by the phosphoenolpyruvate: glyucose phosphotransferase system", *J. Biol. Chem.*, 275(42): 33084-33090.
- Khor, E. ve Lim, L.Y., (2003), "Implantable applications of chitin and chitosan", *Biomaterials*, 24: 2339-2349.
- Kombrink, E., ve Somssich, I.E., (1995), "Defense responses of plants to pathogens", *Adv. Bot. Res.*, 21: 2-34.
- Kramer, K.J., Koga, D., (1986), "Insect chitin. Physiological state, synthesis, degradation and metabolic regulation.", *Insect Biochem.*, 16: 851-877.
- Kubicek, C.P. ve Harman, G.E., (1998), " *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics", Taylor & Francis, London.
- Kumar, M.N.V.R., (2000), "A review of chitin and chitosan applications", *React. Funct. Polym.*, 46: 1-27.

- Lee, S., Cho, J.S., ve Cho, G., (1999), "Antimicrobial and blood repellent finishes for cotton and nonwoven fabrics based on chitosan and fluoropolymers", *Textile Res. J.*, 69(2): 104-113.
- Limon, M.C., Lora, J.M., Garcia, I., Delacruz, J., Llobell, A., Benitez, T., Pintortoro, J.A., (1995), "Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*", *Curr. Genet.*, 28: 478-483.
- Limon, M.C., Margolles-Clark, E., Benitez, T. ve Penttila, 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., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.L., Di Pietro, A., (1993). "Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase", *Phytopathology*, 83: 302-307.
- Lorito, M., Woo, S.L., Garcia Fernandez, I., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Mucciflora, S., Lawrence, C.B., Zonia, A., Tuzun, S., ve Scala, F., (1998), "Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95: 7860-7865.
- Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Payer, K., Jaksits, S., Woo, S.L., Zeilinger, S., Kulling, C.M., Lorito, M. ve Kubicek, C.P., (1999), "Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals", *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(5): 1858-1863.
- Mazeau, K., Winter, W.T. ve Chanzy, H., (1994), "Molecular and crystal-structure of a high-temperature polymorph of chitosan from electron-diffraction data", *Macromolecules*, 27 (26): 7606-7612.
- Merzendorfer, H., Zimoch, L., (2003), "Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases", *J. Exp. Biol.*, 206: 4393-4412.
- Miller, G.L., (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- Minke, M. Ve Blackwell, J., (1978), "Structure of alpha-chitin", *J. Mol. Biol.*, 120(2): 167-181.
- 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.
- Muzzarelli, R.A.A., (1977), "Chitin", Pergamon Press, Oxford.
- Muzzarelli, R.A.A., Ilari, P., Tarsi, R., Dubini, B., Xia, W., (1994), "Chitosan from *Absidia coerulea*", *Carbohydr. Polym.*, 25: 45-50.
- Muzzarelli, R.A.A., (1996), "Chitosan-based dietary foods", *Carbohydr. Polym.*, 29(4): 309-316.
- Muzzarelli, R.A.A., Terbojevich, M., Cosani, A., (1996), "Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain", *Carbohydr. Polym.*, 29:63-68.
- Muzzarelli, R.A.A. ve Muzzarelli, C., (1998), "Native and modified chitins in the biosphere", *ACS Symposium Series*, 707:148-162.

- Muzzarelli, R.A.A., (1999), "Native, industrial, and fossil chitins. In Muzzarelli R.A.A and Jooaes P. editors, Chitin and chitinases", Birkhauser Verlag., Basel, Switzerland.
- Muzzarelli, R.A.A., Terbojevich, M., Muzzarelli, C., Francescangeli, O., (2002), "Chitosans depolymerized with the aid of papain and stabilized as glycosylamines", Carbohydr. Polym., 50: 69-78.
- No, H.K., Meyers, S.P., Lee, K.S., (1989), "Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste", J. Agric. Food Chem., 37(3): 575-579.
- Orhan, N., (2005), "Küf mantarlarından kitinazın indüksiyonu ve karakterizasyonu", Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- 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(42): 33077-33083.
- Patil, R.S., Ghormade, V. and Deshpande, M.V., (2000), "Chitinolytic enzymes: an exploration.", Enzyme Microb. Technol., 26: 473-483.
- Paulitz, T.C. ve Belanger, R.R., (2001), "Biological control in greenhouse systems", Annu. Rev. Phytopathol., 39: 103-133.
- Perrakis, A., Wilson, K.S., Chet, I., Oppenheim, A.B., Vorgias, C.E., (1993), "Phylogenetic relationships of chitinases. In: Muzzarelli R.A.A., editor, Chitin Enzymology", Ancona: Eur. Chitin Soc., p. 217-232.
- Peterbaur, C.K., Lorito, M., Hayes, C.K., Harman, G.E., Kubicek, C.P., (1996), "Molecular cloning and expression of the *nag1* gene (*N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1, Curr. Genet., 30: 325-331.
- Pinelli, S.A., Toledo, G.A., Esquerre, B.I., Luviano, S.A., Higuera, C.I., (1998), "Shrimp shell waste as a source of chitin biopolymers", Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 48(1): 58-61.
- Rast D.M., (1993), "Nomenclature. In: Muzzarelli R.A.A., editor. Chitin Enzymology", Ancona: Eur. Chitin Soc., p.VII-VIII.
- Revahmoiseev, 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, G.A.F., (1992), "Chitin in chemistry", London, Macmillan.
- Rudall, K.M. ve Kenchington, W., (1973), "Chitin system", Biologic. Rev. Cambridge Philosophic. Soc., 48(4): 597.
- Roiger, D.J., Jeffers, S.N. ve Caldwell, R.W., (1991), "Occurence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soil", Soil Biol. And Biochem., 23: 353-359.
- Roy, I., Sardar, M. Ve Gupta, M.N., (2003), "Hydrolysis of chitin by Pectinex", Enzyme Microb. Technol., 32: 582-588.
- 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(13): 3867-3873.

- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. ve Jeon, Y.J., (1999), "Food applications of chitin and chitosan", Trends Food Sci. Tech., 10: 37-51.
- Shaikh, S.A., Deshpande, M.V., (1993), "Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research", World J Microbiol. Biotechnol., 9(4): 468-475.
- Spindler, K. ve Spindler, B.M., (1990), "Chitin metabolism: a target for drugs against parasites", Parasitol. Res., 76: 283-288.
- Subasinghe, S., (1995), "The development of crustacean and mollusc industries for chitin and chitosan resources. In: Zakaria, M.B., Wan Muda, W.M., Abdullah, M.P., editors. Chitin and Chitosan.", Malaysia: Penerbit Universiti Kebangsaan, p. 27-34.
- Sunny, M.C., Ramesh, P., Varma, H.K., (2002), "Microstructured microspheres of hydroxyapatite bioceramic", J. Materials Sci. Materials in Medicine, 13(7): 623-632.
- Synowiecki, J. ve Al-Khateeb, A.N., (2003), "Production, Properties, and Some New Application of Chitin and Its Derivatives", Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43(2): 145-171.
- 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.
- 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(2): 646-647.
- Topal-Sarıkaya, A., (2002), "Endüstriyel Mikroorganizmalar Ders Notları", İstanbul Üniversitesi.
- Tracey, M.V., (1995), "Chitinase in some basidiomycetes", Biochem. J., 61: 579-586.
- Tronsmo, A., (1989), "Trichoderma harzianum used for biological control of storage rot on carrots", Norwegian J. Agric. Sci, 3: 157-161.
- Tutel, B. Ve Çırpıcı, A., (1999), "Sporlu Bitkiler Sistematığı Laboratuvar Kılavuzu", İstanbul Üniversitesi Yayınları, Çantay Kitabevi, İstanbul.
- Viterbo, A., Haran, S., Friesem, D., Ramot, O., Chet, I., (2001), "Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chi36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM, FEMS Microbiol. Lett., 200: 169-174.
- Wan, A.C.A., Khor, E., Hastings, G.W., (1997), "Hydroxyapatite modified chitin as potential hard tissue substitute material", J. Biomed. Materials Res. Appl. Biomaterials, 38(3): 235-241.
- 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.
- Zakaria, Z., (1997), "Lactic acid purification of chitin from prawn waste using a horizontal rotating bioreactor", Ph. D. Thesis, Loughborough University.
- Zechmeister, L. ve Tóth, G., (1939), "Chromatographic adsorption of the enzymes of emulsin which act on chitins", Enzymologia, 7: 165-169.

INTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://www.wikipedia.com>
- [2] <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html>
- [3] <http://www.nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/Trichoderma>
- [4] <http://www.byebyemold.com>
- [5] <http://www.rinconvitova.com/images/trichoderma%20spores.gif>
- [6] <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/EC3/2/1/14.html>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 21.06.1979

Doğum yeri İzmit

Lise 1993-1997 İzmit Anadolu Ticaret Meslek Lisesi

Lisans 1998-2002 İstanbul Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans 2002-... Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı

Çalıştığı kurum(lar)

2005-... GYTE Biyoloji Bölümü-TÜBİTAK Projesi Yardımcı
Araştırmacısı