



***Stenotrophomonas maltophilia*'DAN KİTİNAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE
BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**

Çiğdem AKTAŞ

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

Eş Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Sümeyra GÜRKÖK

2021

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***Stenotrophomonas maltophilia*'DAN KİTİNAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK
UYGULAMALARI**

Çiğdem AKTAŞ

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ
Eş Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Sümeyra GÜRKÖK**

Ana Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2021

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

***Stenotrophomonas maltophilia*'DAN KİTİNAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK
UYGULAMALARI**

Prof. Dr. Arzu Görmez danışmanlığında, Çiğdem AKTAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 22 / 02 / 2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile (5/5)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza:

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Derya EFE

İmza:

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Sümeyra GÜRKÖK

İmza:

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Ramazan KALIN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

*Bu tez çalışması Erzurum Teknik Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından 2019/18 no'lu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

22 / 02 / 2021

Çiğdem AKTAŞ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Stenotrophomonas maltophilia'DAN KİTİNAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI

Çiğdem AKTAŞ

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Arzu GÖRMEZ

Bu tez çalışması kapsamında; kültür koleksiyonumuzda bulunan bakteri izolatlarının kitinaz aktiviteleri araştırıldı ve en iyi kitinaz aktivitesi gösteren izolat belirlenerek klasik (morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal) ve moleküler yöntemlerle (16S rRNA dizi analizi) tanımlandı. *Stenotrophomonas maltophilia* (Gen Bank No: MW600524) olarak tanımlanan izolattan kitinaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi yöntemiyle saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık ve pH'sı, V_{max} ve K_m değerleri ile sıcaklık ve pH stabiliteleri belirlendi. Enzim aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonları (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}), reaktifler (%1-5 EDTA, H_2O_2 , SDS, Tween 20 ve Tween 80) ve çözücülerin (%5-15 DMSO, aseton, gliserol, etanol, izopropanol) etkisi araştırıldı. Saflaştırılan kitinaz enziminin antifungal ve biyoinsektisit olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla önemli tarımsal hastalık ve zararlılara karşı etkisi incelendi. Yapılan çalışmalar sonucunda kitinaz enzimi %30 amonyum sülfat konsantrasyonunda %40,7 verimle, 1,4 kat saflaştırıldı. Kısmi saflaştırmanın akabinde iyon değişim kromatografi tekniğiyle HiPrep Q XL 16/10 kolonu ve HiPrep™ 26/10 Desalting kolonu kullanılarak sırasıyla %25,34 ve %18,12 verimle saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemiyle 52 kDa olarak hesaplandı. Enzimin optimum sıcaklığı 50 °C ve optimum pH değeri 7,0 olarak belirlendi. 1 mM konsantrasyondaki Fe^{2+} , Cd^{2+} ve Mn^{2+} iyonları ile 5 mM konsantrasyondaki Mg^{2+} ve Fe^{2+} iyonları enzim aktivesini artırırken, test edilen tüm çözücü ve reaktiflerin enzim aktivitesini düşürdüğü tespit edildi. Kolloidal kitin için enzimin V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 1,07 $\mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ ve 0,6 mg/ml olarak hesaplandı. Saflaştırılan enzimin *Fusarium oxysporium*'un çimlenmesi ve hifsel gelişimini olumsuz etkilediği, *Leptinotarsa decemlineata* böceğinin ise kitin yapısında bozulmalara sebep olduğu belirlendi.

2021, 71 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Stenotrophomonas maltophilia*, kitinaz, enzim saflaştırma, antifungal aktivite, biyoinsektisit

ABSTRACT

MS. Thesis

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF CHITINASE ENZYME FROM *Stenotrophomonas maltophilia*

Çiğdem AKTAŞ

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

Within the scope of this thesis, the chitinase activities of the bacterial isolates in our culture collection were investigated and the isolate with the best chitinase activity was determined and identified by classical (morphological, physiological, biochemical) and molecular (16S rRNA sequencing) methods. Chitinase enzyme was purified from the isolate identified as *Stenotrophomonas maltophilia* (Genbank No: MW600524) by ammonium sulphate precipitation and ion exchange chromatography. Optimum temperature and pH, V_{max} and K_m values, and temperature and pH stability of the purified enzyme were determined. The effects of various metal ions (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}), reagents (%1-5 EDTA, H_2O_2 , SDS, Tween 20 and Tween 80) and solvents (%5-15 DMSO, acetone, glycerol, ethanol, isopropanol) on enzyme activity were investigated. The effect of purified chitinase enzyme against major agricultural diseases and pests was investigated in order to determine its usability as antifungal and bioinsecticide. According to the results of the studies, the chitinase enzyme was purified 1,4 times at 30% ammonium sulphate concentration with a yield of 40,7%. Following partial purification, the enzyme was purified by ion exchange chromatography technique using HiPrep Q XL 16/10 column and HiPrep™ 26/10 desalting column with 25,34% and 18,12% yields, respectively. The molecular weight of the purified enzyme was calculated as 52 kDa by SDS-PAGE method. The optimum temperature of the enzyme was determined to be 50 °C and the optimum pH value as 7,0. While Fe^{2+} , Cd^{2+} and Mn^{2+} ions at 1 mM concentration and Mg^{2+} and Fe^{2+} ions at 5 mM concentration increased enzyme activity, all the tested reagents and solvents decreased the enzyme activity. V_{max} and K_m values of the enzyme for colloidal chitin were calculated as 1.07 $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ and 0,6 mg/ml, respectively. Purified enzyme negatively affected the germination and hyphal development of *Fusarium oxysporum*, and caused deterioration in the chitin structure of the *Leptinotarsa decemlineata* insect.

2021, 71 page

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia*, chitinase, enzyme purification, antifungal activity, bioinsecticide

TEŞEKKÜR

İlk olarak bu tezin gerçekleştirilmesinde bilgi birikimlerinden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum, değerli danışmanım Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ'e gösterdiği hoşgörü ve sabrından dolayı teşekkür ederim.

Tezim süresince fikirlerini, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli eş danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Sümeyra GÜRKÖK ve değerli hocam Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye,

Tezim süresince yardımlarını eksik etmeyen değerli hocam Arş. Gör. Damla RÜZGAR'a sabrından ve bana kattıklarından dolayı,

Desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Şeymanur Çobanoğlu ve Merve Yıldırım'a yardımlarından dolayı,

Teknik ve idari desteklerinden dolayı Erzurum Teknik Üniversitesi (ETÜ) Yüksek Teknoloji ve Araştırma Merkezi (YÜTAM) birimine,

Tez çalışmasında kullanılan biyolojik materyallerin temini için Atatürk Üniversitesi Biyoçeşitlilik Uygulama ve Araştırma Merkez Müdürü Prof. Dr. Levent GÜLTEKİN'e,

Eğitimim boyunca destek aldığım tüm hocalarıma,

Finansal olarak çalışmamızı destekleyen ETÜ BAP Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: 2019/18) teşekkür ederim.

Son olarak da beni büyük fedakarlıklar ile bugüne getiren, maddi manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen başta babam Kenan Niyazi AKTAŞ ve annem Gülsüme AKTAŞ olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Çiğdem AKTAŞ
Şubat, 2021

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimlerin Yapısı.....	1
1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması	2
1.3. Mikrobiyal Enzimler ve Kullanım Alanları	3
1.4. Kitin ve Kitinazlar.....	4
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM	12
3.1. Materyal	12
3.1.1. Kullanılan cihazlar	12
3.1.2. Kullanılan izolatlar.....	13
3.1.3. Kullanılan kimyasallar, kitler ve çözeltiler	13
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Kolloidal kitinin hazırlanması.....	18
3.2.2. Kitinaz aktivitesi olan izolatların belirlenmesi	18
3.3. Kitinaz Aktivitesi Gözlenen İzolatın Morfolojik Özelliklerinin Araştırılması	20
3.3.1. Hücre morfolojisinin belirlenmesi	20
3.3.2. KOH testi	20
3.3.3. Hareketlilik testi	21
3.4. Kitinaz Aktivitesi Gözlenen İzolatın Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	21
3.4.1. İzolatın gelişim gösterebildiği sıcaklık aralığının belirlenmesi	21
3.4.2. İzolatın gelişim gösterdiği pH aralığının belirlenmesi.....	21
3.4.3. İzolatın gelişim gösterdiği tuz konsantrasyonunun belirlenmesi	21
3.5. Kitinaz Aktivitesi Gözlenen İzolatın Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi....	22

3.5.1. Katalaz testi	22
3.5.2. Amilaz testi	22
3.5.3. Proteaz testi	22
3.5.4. Hemoliz testi	22
3.6. Kitinaz Aktivitesi Gözlenen İzolatın Moleküler Tanılanması	23
3.6.1. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması.....	23
3.6.2. Klonlanan dizilerin analizi ve izolatın tanılanması.....	28
3.7. Kitinaz Enziminin Saflaştırılması	29
3.7.1. Santrifüjleme	29
3.7.2. Amonyum sülfat çöktürmesi (Salting Out)	29
3.7.3. Diyaliz	30
3.7.4. İyon değişimi kromatografisi	30
3.8. Saflaştırılan Enzimin Karakterizasyonu.....	31
3.8.1. Enzimin molekül ağırlığının belirlenmesi.....	31
3.8.2. Kitinaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi ..	32
3.8.3. Kitinaz enziminin optimum pH'sının ve pH stabilitesinin belirlenmesi.....	32
3.8.4. Metal iyonlarının kitinaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	33
3.8.5. Çeşitli reaktiflerin kitinaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi	33
3.8.6. Çeşitli organik çözücülerin kitinaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi	33
3.8.7. Kitinaz enzim reaksiyonuna ait K_m ve V_{max} kinetik sabitlerinin belirlenmesi.....	33
3.9. Kitinaz Enziminin Biyoteknolojik Uygulamaları	34
3.9.1. Kitinaz enziminin antifungal aktivitesinin belirlenmesi	34
3.9.2. Kitinaz enziminin patates böceği (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) üzerine etkisinin incelenmesi.....	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	36
4.1. Katı Besi Ortamında Kitinaz Aktivitesinin Belirlenmesi	36
4.2. Sıvı Kültürde Kitinaz Aktivitesinin Belirlenmesi	36
4.3. Kitinaz Aktivitesi Tespit Edilen İzolatın Morfolojik, Biyokimyasal ve Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	37
4.4. Moleküler Sonuçlar	37
4.4.1. 16S rRNA PCR sonuçları	37
4.4.2. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması.....	38
4.4.3. 16S rRNA sekans analizi	39
4.5. Kitinaz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması	39

4.5.1. Kitinaz enziminin üretimi	39
4.5.2. Protein tayini ve enzim aktivitesi için hazırlanan standart grafikler.....	39
4.5.3. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	40
4.5.4. İyon değişim kromatografisi	41
4.6. Saflaştırılan Kitinaz Enziminin Karakterizasyonu.....	42
4.6.1. Kitinaz enziminin saflık kontrolü ve molekül ağırlığının belirlenmesi	42
4.6.2. Kitinaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi ..	43
4.6.3. Kitinaz enziminin optimum pH'sının ve pH stabilitesinin belirlenmesi.....	45
4.6.4. Kitinaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi.....	47
4.6.5. Kitinaz enzimi üzerine çeşitli reaktiflerin etkisinin belirlenmesi	49
4.6.6. Kitinaz enzimi üzerine çeşitli çözücülerin etkisinin belirlenmesi.....	51
4.6.7. Kitinaz enzim reaksiyonuna ait K_m ve V_{max} kinetik sabitlerinin belirlenmesi	53
4.7. Kitinaz Enziminin Biyoteknolojik Uygulamaları	55
4.7.1. Kitinaz enziminin antifungal aktivitesinin belirlenmesi	55
4.7.2. Kitinaz enziminin patates böceği üzerine etkisinin incelenmesi.....	58
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR	63
EKLER.....	71
EK 1.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
------------------------	------------------------

°C	Santigrat Derece
dk	Dakika
EU	Enzim Ünitesi
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
OD	Optik Densite
sn	Saniye
α	Alfa
β	Beta
μ l	Mikrolitre

Kısaltmalar

APS	Amonyum persülfat
BSA	Sığır serum albumin
ChBD	Kitin bağlayıcı bölge
CHDA	Chitinase-detection agar
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNS	Dinitrosalisilik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
GlcNAc	N-Asetilglukozamin
IPTG	β -D-1-tiyogalakto piranosid
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

rDNA	Ribozomal DNA
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TEMED	N, N, N, N-tetrametiletildiamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	TrypticSoy Broth



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Kollodial Kitinli Katı Kültürde Kitinaz Aktivitesinin Belirlenmesi	36
Şekil 4.2. AA-439 Bakteri İzolatının Kitinaz Zon Görüntüsü	37
Şekil 4.3. 16S rRNA PCR Jel Görüntüsü	38
Şekil 4.4. Koloni PCR Jel Görüntüsü	38
Şekil 4.5. Kollodial Kitinli Sıvı Besiyerinde Bakteriyel Gelişim.....	39
Şekil 4.6. BSA Standart Grafiği.....	40
Şekil 4.7. N-asetil glukozamin Standart Grafiği.....	40
Şekil 4.8. SDS-PAGE Sonucuyla Oluşturulan Log Ma-R _f Grafiği	42
Şekil 4.9. Saflaştırılan Kitinaz Enziminin SDS-PAGE Görüntüsü	43
Şekil 4.10. Saflaştırılan Kitinaz Enziminin Optimum Sıcaklığı	44
Şekil 4.11. Kitinaz Enziminin Kararlılığı Üzerine Sıcaklığın Etkisi	44
Şekil 4.12. Kitinaz Enziminin Optimum pH Grafiği	46
Şekil 4.13. Kitinaz Enziminin Kararlılığı Üzerine pH Etkisi	46
Şekil 4.14. Kitinaz Enzimi Üzerine 1 mM Metal İyonlarının Etkisi	48
Şekil 4.15. Kitinaz Enzimi Üzerine 5 mM Metal İyonlarının Etkisi	49
Şekil 4.16. Kitinaz Enzimi Üzerine %1 Oranında Kullanılan Reaktiflerin Etkisi.....	50
Şekil 4.17. Kitinaz Enzimi Üzerine %5 Oranında Kullanılan Reaktiflerin Etkisi.....	51
Şekil 4.18. Kitinaz Enzimi Üzerine %5 Konsantrasyondaki Çözücülerin Etkisi	52
Şekil 4.19. Kitinaz Enzimi Üzerine %15 Konsantrasyondaki Çözücülerin Etkisi	53
Şekil 4.20. Kitinaz Enziminin Lineweaver-Burk Grafiği	54
Şekil 4.21. Kitinaz Enziminin Antifungal Etkisi	55
Şekil 4.22. Kitinaz Enziminin 6. Saatte Spor Çimlenmesi Üzerine Etkisi	56
Şekil 4.23. Kitinaz Enziminin 24. Saatte Spor Çimlenmesi Üzerine Etkisi	56
Şekil 4.24. Kitinaz Enziminin Hif Büyümesi Üzerine Etkisi	57
Şekil 4.25. Kitinaz Enziminin Patates Böcekleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	58
Şekil 4.26. Kitinaz Enziminin Patates Böcekleri Üzerine Etkisinin 500X SEM Görüntüsü.....	59
Şekil 4.27. Kitinaz Enziminin Patates Böcekleri Üzerine Etkisinin 1000X SEM Görüntüsü.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzim Sınıfları ve Özellikleri	3
Çizelge 1.2. Bazı Mikrobiyal Enzimlerin Endüstriyel Kullanım Alanları.....	4
Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	12
Çizelge 3.2. PCR Reaksiyon Karışımı	24
Çizelge 3.3. 16S rRNA PCR Programı	25
Çizelge 3.4. Ligasyon Reaktifleri ve Kullanılan Miktarları	26
Çizelge 3.5. Koloni PCR Reaksiyon Karışımı	27
Çizelge 3.6. SDS-PAGE Jel Bileşenleri	32
Çizelge 4.1. <i>S. maltophilia</i> 'dan İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılan Kitinaz Enziminin Saflaştırma Tablosu	41
Çizelge 4.2. Kitinaz Enzimi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi	48
Çizelge 4.3. Kitinaz Enzimi Üzerine Reaktiflerin Etkisi	50
Çizelge 4.4. Kitinaz Enzimi Üzerine Çözücülerin Etkisi	52
Çizelge 4.5. Kitinaz Enziminin Substrat Konsantrasyonu-Aktivite Grafiği.....	54
Çizelge 4.6. Saflaştırılan Kitinaz Enziminin Spor Çimlenmesi Üzerine Etkisi.....	56

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artması ve buna bağlı olarak artan küresel talep nedeniyle ucuz, üretimi kolay, doğal, çevreye zarar vermeyen ve ekolojik döngüde parçalanması kolay biyoteknolojik ürünlere olan ilgi oldukça artmıştır. Bu ürünlerin başında da hücre içinde ve/veya dış ortamda aynı şekilde işlev görebilen enzimler gelmektedir. Enzim kelimesi ilk olarak 1878’de Kühna tarafından kullanılmış olup Yunanca “maya” anlamına gelmektedir (Aehle 2004). Enzimler genellikle biyodegrede olabilen, toksik olmayan, görev aldıkları reaksiyonlarda çoğunlukla kalıcı bir değişikliğe uğramaksızın aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını artıran biyolojik makromoleküllerdir (Singh et al. 2016). Enzimler, katalizledikleri reaksiyonlar ve substrat seçiminde oldukça spesifikler (Negi and Banerjee 2009). Canlı hücreler tarafından sentezlenen enzimlerden hücre içinde faaliyet gösterenler “intraselüler (hücre içi)”, hücre dışına salgılanıp hücre dışında faaliyet gösterenler de “ekstraselüler (hücre dışı)” enzim olarak adlandırılmaktadır (Köse 2015). Enzimlerin aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları gerekli olmadığından, biyolojik sistemlerin dışında farklı amaçlarla eski çağlardan beri şarap, sirke, bira, ekmek, peynir, yoğurt, çivit ve deri gibi ürünlerin üretiminde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Rüzgar 2019).

1.1. Enzimlerin Yapısı

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç enzimler genellikle protein yapıdadırlar (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Enzim proteinlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları, enzimin katalitik yapısı için oldukça önemlidir (Hacıabdullahoğlu 2018). Bu nedenle enzimlerin katalitik aktiviteleri protein konformasyonlarının bütünlüğü ile ilgili olup denatüre olması ya da aminoasit bileşenlerine parçalanması durumunda genellikle aktivitelerini kaybetmektedirler.

Enzimler, katalizleme reaksiyonlarını gerçekleştirirken çoğu zaman farklı gruplara ihtiyaç duymaktadırlar. Bu farklı gruplar; koenzim adı verilen kompleks yapıda organik bir bileşik ya da kofaktör denilen metal iyonları olabilmektedir. Enzimin kofaktörsüz olan protein bölümüne "apoenzim", koenzimle birlikte olan enzim molekülüne ise "haloenzim" adı verilmektedir. Apoenzimlerin aminoasit türleri ve

dizilişleri enzimlerin türlerine göre farklılık göstermektedir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve spesifikliğini belirleyen kısım apoenzimdir. Apoenzimler, koenzimler ile birlikte iken katalitik aktivite kazanmaktadırlar (Köse 2015). Enzimlerin tesir ettiği moleküllere substrat adı verilmektedir ve enzimler katalizledikleri reaksiyonlarda substratları ürünlere dönüştirmektedirler (Kuzu 2008). 1894 yılında Alman bilim adamı Hermann Emil Fischer'in önerdiği anahtar kilit modelinde; substratın enzimin etken bölümüne uygun formda bağlandığı öne sürülmüştür. Önerilen bir diğer model ise indüklenmiş uyumdur. Bu modelde ise substrat ortamda olmadığında enzim serbest formda bulunmakta ve substrat ortama eklendiğinde enzim substrata bağlanacak şekilde farklılaşmaktadır (Nelson and Cox 2004, Hacıabdullahoğlu 2018).

1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler, Uluslararası Enzim Komisyonu (IUBMB) tarafından, mekanizmaları ve katalizledikleri reaksiyonlar göz önüne alınarak sistematik bir isim ve enzim kod numarası (E.C) kullanarak sınıflandırılmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2009, Gurung et al. 2013). Katalizlediği tepkime türüne göre oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı sınıfa ayrılan (Çizelge 1.1.) enzimler kullanım amaçlarına bağlı olarak da farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Saflık derecesi düşük olan ve kimyasal reaksiyonları yöneten “endüstriyel enzimler”, saflık derecesi yüksek olan ve bilimsel çalışmalarda kullanılan “analitik enzimler” ve saflık derecesi çok yüksek olan ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılan “klinik enzimler” olmak üzere üç grupta tasnif edilmektedirler. Bu alanlarda kullanılan enzimlerin bir kısmı bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilse de çoğu mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Kuzu 2008).

1. GİRİŞ

Çizelge 1.1. Enzim Sınıfları ve Özellikleri (Ha and Bhagavan 2011; Gurunget al. 2013)

Enzim Komisyonu Numarası	Enzim Sınıfları	Özellikleri
EC 1	Oksidoredüktazlar	Oksidasyon tepkimelerinde moleküller arası elektron aktarımı sağlar. Biyolojik tepkimelerde substrat hidrojen kaybeder. Bu gruptaki enzimler dehidrogenazlar olarak adlandırılır.
EC 2	Transferazlar	İki molekül arasında hidrojen dışında açıl benzeri grupların transferini sağlayan enzimlerdir.
EC 3	Hidrolazlar	Su yardımıyla substratların parçalanmasını sağlayan enzim gruplarıdır.
EC 4	Liyazlar	C-C, C-O, C-S, C-N benzeri bağların oluşumunu susuz ortamda gerçekleştiren enzimlerdir.
EC 5	İzomerazlar	Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüşümünü sağlayan enzimlerdir.
EC 6	Ligazlar	Moleküller arası kovalent bağların oluşumunu sağlayan enzimlerdir.

1.3. Mikrobiyal Enzimler ve Kullanım Alanları

Mikroorganizmaların büyüme ortamlarının diğer kaynaklardan elde edilenlere nazaran daha ekonomik olması, gelişim hızlarının yüksek olması, üretmiş oldukları enzimlerin çok daha kolay elde edilebilir olması, enzim üretiminde düzenli kaynak sağlayabilmesi ve çeşitli ekstrem koşullarda stabiliteleri ve katalitik aktivitelerinin oldukça yüksek olması gibi nedenlerle mikrobiyal enzimler, endüstriyel işlemlerde çok daha güvenilir kaynaklar olarak tercih edilmektedir (Rüzgar 2019). Son yıllarda endüstriyel alanda kullanılan proteaz, amilaz, pektinaz, glukozizomeraz, selüloz, galaktozidaz, kitinaz, ksilanaz vb. pek çok enzimin mikrobiyal kaynaklardan izole edilerek biyoteknolojide yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Çizelge 1.2). Bu enzimlerden biri olan ve pek çok kullanım alanına sahip olan kitinaz enzimi de uygun bir üretici mikroorganizmanın varlığında kolaylıkla üretilerek endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır (Kuzu 2008).

1. GİRİŞ

Çizelge 1.2. Bazı Mikrobiyal Enzimlerin Endüstriyel Kullanım Alanları

Enzimler	Kullanım Alanları	Referanslar
Proteaz	Deri işleme (derinin kıllardan arındırılması) Gıda endüstrisi (peynir yapımı, proteince yüksek gıdalar, tahıl ezme) Fotoğrafçılık(gümüş kazanımı) Deterjan endüstrisi (leke çıkarıcı)	Sabotič and Kos 2012 Kumaran et al. 2013 Banerjee and Ray 2017
Amilaz	Gıda endüstrisi (ekmek yapımı, fruktoz ve glukoz şurubu, meyve suyu yapımı) Kağıt endüstrisi (kağıt hamuru) Deterjan endüstrisi (leke çıkarıcı)	Pandey et al. 2000
Lipaz	Deterjan endüstrisi (yağların parçalanması) Eczacılık (transesterifikasyon, hidroliz) Kozmetik (emülsifiyer, nemlendirici)	Tarakçıoğlu 2016
Selülaz	Kağıt endüstrisi (kağıt hamuru yapımı) Tekstil endüstrisi (kumaş taşlama) Deterjan endüstrisi (renklerin korunması)	Kuhad et al. 2011 Menendez et al. 2015
Ksilanaz	Kağıt endüstrisi (kağıt hamurunu beyazlatma, Gıda endüstrisi (içeceklerde durultma ve berraklaştırma) Besi yemi endüstrisi (yem kalitesinin artırılması)	Gilbert and Hazlewood 1993 Aehle 2004 Rıfaat et al. 2005
Pektinaz	Gıda endüstrisi (meyve suyu berraklaştırma)	Adapa ve ark. 2014

1.4. Kitin ve Kitinazlar

Kitin ($C_8H_{13}O_5N$), doğada en çok bulunan polimerler içinde ikinci sırada yer alan, N-Asetil-D-glukozamin monomerlerinin (Glc-NAc) β -1,4 glikozidik bağlarla bağlanması ile oluşmuş beyaz, sert, elastik olmayan, azotlu bir polisakkarittir (Kumar 2000, Dutta et al. 2004). Dünyada yıllık üretimi oldukça fazla olan kitin, fungusların hücre duvarı ile deniz kabukluları (yengeç, istakoz, karides gibi) ve böceklerin dış kabuğunda, yumuşakçaların radulaları (dişli dil), ahtapot ve mürekkep balığının dâhil olduğu kafadan bacaklıların ağız kısımlarında bulunmaktadır. Suda yaşayan ve karaya vuran ürünlerin

(karides, yengeç, kalamar, istiridye ve mürekkep balığı) neredeyse %10'u kitinden zengin organizmalardan meydana gelmektedir.

Evrensel olarak kabul edilmiş toksik olmayan, biyolojik olarak bozulabilen doğal bir polimer olan kitinin parçalanmasını katalizleyen kitinazların (EC 3.2.1.14), N-asetilglukozamin multimerlerini oluşturan endokitinazlar ve polimerin indirgenmemiş ucundan başlayan düşük molekül ağırlığına sahip, çözünebilen dimerlerin sürekli salınmasını katalizleyen ekzokitinazlar olmak üzere, iki alt grubu bulunmaktadır (Donderski and Brzezinska 2005; Özgen 2011). Kitinazlar; bakteriler, yüksek bitkiler, kabuklular, böcekler, mantarlar ve bazı omurgalılar tarafından farklı amaçlarla üretilmektedirler (Jeuniaux 1966; Flachet et al. 1992). Bitkiler genellikle savunma amaçlı olarak (fungal kaynaklı bitki hastalıklarının biyolojik kontrolünde ve böcek zararlarından korunmada) kabuklular eski kütikülün uzaklaştırılmasında, bakteriler ise enerji kaynağı olarak kitinaz üretmektedirler. Bunun dışında pek çok organizmada hücre duvarının/dış iskeletin morfojenezi ve polimerlerin degradasyonu için kitinaz enzimini üretmektedirler (Abeleset et al. 1971; Gooday 1977; Bell 1981; Roberts and Selitrennikoff 1988; Mathivanan et al. 1998). Bu nedenle canlılar tarafından üretilen kitinazların organizmalardaki rolleri oldukça farklılık göstermektedir.

Biyoteknolojik olarak çeşitli kaynaklardan elde edilen kitinazlar, biyolojik olarak atıkların değerli ürünlere dönüştürülmesinde, gıda ürünlerinin yapımında, hastalıkların tedavisinde, tarım ve çeşitli endüstriyel alanlarda (biyokontrol ajanı, biyomateryal üretimi, tatlandırıcı, büyüme faktörü vs) yoğun olarak kullanılmaktadırlar (Kumar 2000; Patil et al. 2000). Özellikle bakteriler, mantarlar, yüksek bitkiler, böcekler, kabuklular ve bazı omurgalıların önemli kitinaz üreticisi olduğu bilinmektedir (Jeuniaux 1966; Shubakov 1992; Flach and Kucheryavykh 2004).

Bakterilerde çoğunlukla nitrojen ve karbon kaynağı olarak bilinen kitinazlar özellikle *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Beneckea*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* ve *Vibrio* cinsine ait izolatlar tarafından üretilmektedir (Matsumoto 2006; Bhattacharya et al. 2007). *Stenotrophomonas* cinsine ait *Stenotrophomonas maltophilia*, basil formunda düz veya hafif kıvrık şeklinde, 0,5–1,5 µm uzunluğunda, tek veya çiftler halinde bulunabilen,

flagellaları sayesinde hareket edebilen Gram negatif aerobik bir bakteridir. İlk olarak 1943'te J. L. Edwards tarafından plevral sıvıdan izole edilen ve o yıllarda “*Bacterium bookeri*” olarak isimlendirilen bakteri sonrasında *Pseudomonas maltophilia* ve son olarak da *S. maltophilia* olarak isimlendirilmiştir (Çiçek 2019). İnsan ve hayvanların dışında su, toprak ve kanalizasyon ile temas halinde olan bitkisel/hayvansal kaynaklar ve gıdalardan izole edilebilen *S. maltophilia*'dan kitinaz enziminin saflaştırıldığı bilinmektedir (Zhang et al. 2001).

Bakteriyel izolatlardan elde edilen kitinazların biyoteknolojik olarak pek çok alanda kullanıldığı bilinmektedir. Son yıllarda tarımsal alanda önemli hastalıklara neden olan funguslara ve özellikle böcek zararlılarına karşı kitinaz enziminin kullanıldığı bazı çalışmalar bulunmaktadır (Kuzu 2008; Yılmaz 2019).

Bu doğrultuda planlanan bu çalışma da öncelikle kitinaz üreticisi izolatları belirlemek amacıyla mikrobiyal kültür koleksiyonumuzda bulunan yaklaşık 200 bakteri izolatının enzim aktiviteleri tespit edildi. Yapılan test sonuçlarına göre en iyi aktivite gösteren izolat klasik ve moleküler metotlarla tanılandı. *S. maltophilia* olarak tanılanan izolattan kitinaz enzimi saflaştırılarak karakterize edildi. Son olarak saflaştırılan enzimin tarımsal alanda önemli hastalıklardan sorumlu *Fusarium solani* ile tarımsal zararlılardan *Leptinotarsa decemlineata*'ya karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılabilirliği araştırıldı.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Mikrobiyal kaynaklardan izole edilen kitinaz enzimi ve bununla ilgili literatürde yapılan çalışmalar aşağıda sıralanmıştır.

Wen et al. (2002) tarafından yapılan çalışmada topraktan izole edilen *Bacillus* NCTU2 izolatından jel filtrasyon kromatografisi ile kitinaz enzimi %58 verimle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığının 36 ± 5 kDa olduğu, 60 °C ve pH 6,8'de 3 saatten fazla stabil kaldığı tespit edilmiştir. Enzimin optimal sıcaklığının 50-60°C, optimal pH'sının 7,0 olduğu ve enzimin metal iyonlarından Hg^{2+} ve Cu^{2+} ile inhibe edildiği belirlenmiştir.

Toharisman et al. (2005) tarafından yapılan çalışmada, Endonezya'daki Tompaso jeotermal kaynaklarından izole edilen *Bacillus licheniformis* MB-2 izolatından Phenyl Sepharose CL-4B ve DEAE Sephacel Superdex 75 kolonu kullanılarak, iyon değişim kromatografisi ile kitinaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 67 kDa, optimal sıcaklığı 70 °C ve optimal pH'sı 6,0 olarak bulunmuştur. Enzimin, DMSO ve PEG gibi çözücüler ile inhibe edildiği, üre (1 M), Tween-20 (1%) ve Triton-X (1%) ile muamelesi sonucunda da denatürasyona karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Joo (2005) tarafından yapılan çalışmada *Streptomyces halstedii* AJ-7 izolatından kitinaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 55 kDa olarak hesaplanmış ve enzimin koloidal kitin için K_m , V_{max} sabitleri de sırasıyla $3,2 \text{ mg/ml}^{-1}$ ve $118 \text{ } \mu\text{mol h}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Enzimin optimal sıcaklığının 50 °C, optimal pH'sının 7,0 olduğu ve saflaştırılan enzimin *F. oxysporium*'un gelişimini önemli ölçüde engellediği bildirilmiştir.

Lee et al. (2007) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus* sp. DAU101 izolatından elde edilen kitinaz geni *Escherichia coli*'ye klonlanmış ve enzim rekombinant olarak üretilmiştir. Üretilen enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE yardımıyla 66 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzimin optimum pH'sının 7,5, optimal sıcaklığının 60 °C olduğu, Zn^{2+} ,

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Cu^{2+} ve Hg^{2+} 'nin enzim aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği, Co^{2+} 'nin ise enzimin aktivitesini 1,4 oranında artırdığı rapor edilmiştir.

De-hui et al. (2011) tarafından yapılan çalışmada besin bileşenlerinin ve pH'nın termofilik *Paenibacillus* sp. Hul'nin kitinaz ve kitin deasetilaz enzimi üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre optimum karbon kaynağı olarak 35 g/L kitin powder; optimum nitrojen kaynağı olarak 10 g/L yeast extract powder olduğu belirlenmiştir. Kitinaz ve kitin deasetilaz sentezlemek için en uygun başlangıç pH'sının 6,0 olduğu, Cu^{2+} 'nin enzimleri inhibe ettiği, Ca^{2+} 'nin aktive ettiği, Mg^{2+} ve Zn^{2+} 'nin ise etki göstermediği bildirilmiştir.

Jankiewicz et al. (2012) tarafından yapılan çalışmada *S. maltophilia* MU suşundan afinite kromatografisi kullanılarak kitinaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Enzimin en iyi katalitik aktivitesini 45 °C ve pH 6,8'de gösterdiği, 45 °C'de 2 saat boyunca da stabilitesini koruduğu bildirilmiştir. SDS-PAGE yardımıyla saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 52 kDa olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada aynı zamanda *Fusarium*, *Rhizoctonia* ve *Alternaria* cinsine ait fungal izolatlar üzerine enzimin etkisi incelenmiş ve izolatların gelişimlerini inhibe ettiği bildirilmiştir.

Brzezinska et al. (2013) tarafından yapılan çalışmada toprak kaynaklı *Streptomyces rimosus* izolatından afinite kromatografisi kullanılarak kitinaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Aynı zamanda enzimin kitinli bileşikleri parçalama özelliği ve fungal fitopatojen izolatlarla karşı da etkisi incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; enzimin optimum pH'sının 7,0, optimum sıcaklığının 40-45°C olduğu, aktivitesinin Hg^{2+} ve Pb^{2+} iyonları tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 63 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin, kitosan ve karides kabuğu atıklarının dekompozisyonunda oldukça verimli olduğu ve aynı zamanda *Fusarium solani* ve *Alternari alternata* gibi fungal bitki patojenlerine karşı da biyokontrol ajanı olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir.

Shivakumar et al. (2014) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus subtilis* JN032305 izolatından alkalifilik düşük molekül ağırlıklı kitinaz saflaştırılmış ve molekül ağırlığı 14 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin optimum pH'sının 9,0, optimum sıcaklık değerinin

50 °C olduğu ve 50 °C’de 60 dk boyunca stabilitesini koruduğu tespit edilmiştir. Enzimin Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} ve Ba^{2+} metal iyonları tarafından inhibe edildiği, Hg^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının ise enzim üzerine önemli bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda saflaştırılan enzimin *Rhizoctonia solani* ve *Colletotrichum gloeosporioides* üzerine antifungal aktivitesinin olduğu bildirilmiştir.

Aliabadi et al. (2016) tarafından yapılan çalışmada karides yetiştirme havuzlarından izole edilen on iki bakteri izolatının, tek karbon kaynağının kitin olarak belirlendiği ortamda gelişimleri incelenmiştir. *Cohnella* sp. A01 izolatının en yüksek kitinolitik aktiviteye sahip olduğu ve besi ortamında kolloidal kitin, pepton ve K_2HPO_4 ’ün sırasıyla en iyi karbon, nitrojen ve fosfor kaynağı olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Çalışmada kitinaz üretimini etkileyen en önemli faktörlerin inokulasyon miktarı ve inkübasyon sıcaklığı olduğu belirlenmiştir. Enzimin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklığın 70 °C, pH derecesinin 5,0, K_m ve V_{max} değerlerinin de sırasıyla 5,6 mg/ml ve 0,87 μ mol/dk olduğu kaydedilmiştir. Ag^+ , Co^{2+} iyodoasetamid ve iyodo asetik asitin enzim aktivitesini inhibe ettiği, Mn^{2+} , Cu^{2+} , Tweens (20 ve 80), Triton X-100 ve EDTA’nın ise enzim aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir.

Farag et al. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada deniz kaynaklı *Aspergillus terreus* kültür filtratından %65 amonyum sülfat çöktürmesi ve akabinde jel filtrasyon kromatografisinde Sephadex G-100 kolonu ve iyon değişim kromatografisinde de DEAE-Sephadex A-50 kolonu kullanılarak kitinaz enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin optimum pH’sının 5,6, sıcaklığının 50 °C olduğu ve pH 5,0-7,5 arasında 70 °C’ye kadar stabilitesini koruduğu tespit edilmiştir. Enzimin spesifik aktivitesinin 182,08 U/mg, molekül ağırlığının da 60 kDa olduğu bildirilmiştir. Çalışmada aktivatörlerin ve inhibitörlerin etkisi incelenmiş; Hg^+ , Pb, EDTA, etanol, metanol ve asetonun enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği, Ca^{2+} , Mn^{2+} ve Na^{2+} gibi metal iyonlarının ise enzim aktivitesini oldukça artırdığı gözlenmiştir. Aynı zamanda saflaştırılmış kitinazın, *A. niger*, *A. oryzae*, *Penicillium oxysporium*, *R. solani*, *Candida albicans* ve *F. solani*’nin büyümesini inhibe ettiği, *Rhizopus oryzae*’nin büyümesine ise herhangi bir etki göstermediği bildirilmiştir. Bunun yanında enzimin *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* gibi bazı

patojenik bakterilere karşı etkili olduğu, *Photobacterium damsela*'ya ise herhangi bir antibakteriyel etki göstermediği rapor edilmiştir.

Mander et al. (2016) tarafından yapılan çalışmada *Streptomyces anulatus* CS242'den kitinaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografi yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE yardımıyla 38 kDa olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılan enzim katı karides atığı üzerine denenmiş ve enzimin kitin mikrofiberlerini parçaladığı elektron mikroskobu ile gösterilmiştir. Enzimin *A. niger* üzerine antifungal etkisinin olduğu ve fungusun büyümesini önemli derecede inhibe ettiği gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda saflaştırılan enzimin hem biyodönüşüm hemde biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Beltagy et al. (2018) tarafından yapılan çalışmada toprak kaynaklı *A. flavus* (AUMC 13576) izolatından deniz atıkları substrat olarak kullanılarak kitinaz üretimi amaçlanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonu ve DEAE-Selüloz A52 iyon değişim kolonu kullanılarak saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 30 kDa olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan kitinaz enziminin 60 °C, pH 7,5 ve 0,9 g/L substrat konsantrasyonunda en yüksek aktiviteyi (1368.8 U/l) gösterdiği ve 50 °C'de 15 dk süreyle termal stabilitesini koruduğu belirlenmiştir. Test edilen farklı ağır metallere MnCl₂ ve FeSO₄ tarafından enzim aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Aynı zamanda çalışmada enzimin K_m ve V_{max} kinetik ölçüm değerleri sırasıyla 0,18 g kitin/ml ve 274,31 U/L olarak tespit edilmiştir.

Liu et al. (2019) tarafından yapılan çalışmada düşük sıcaklıkta yüksek katalitik aktiviteye sahip kitinaz üreten mikroorganizmaları izole edebilmek için Antartika'daki Fildes Peninsula bölgesinden örnekler toplanmıştır. Çalışmada deniz tortusundan izole edilen kitinaz üreticisi izolat *Pseudomonas* olarak tanılanmış ve bu izolattan elde edilen kitinaz enziminin 35 °C de pH 4,5'te aktivite gösterdiği ve 0 °C'de maksimum aktivitesinin %50'den fazlasını koruyabildiği tespit edilmiştir. Enzimin *F.oxysporum* ve *Cucumerinum* CICC 2532 izolatlarının gelişimlerini olumsuz etkilediği bu nedenle de biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür.

Jankiewicz et al. (2020) tarafından yapılan çalışmada *Stenotrophomona srhizophila* G22 izolatından ekstrasellüler kitinaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi ile (Superdex 200) %63 verimle saflaştırılan enzimin molekül ağırlığının 50 kDa, optimum sıcaklığının 37 °C ve optimum pH'sının ise 5,9 olduğu bildirilmiştir.

Li et al. (2020) tarafından yapılan çalışmada *Serratia marcescens* izolatından saflaştırılan kitinaz geninin *Escherichia coli* BL21 (DE3) izolatına aktararak rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Rekombinant olarak üretilen enzim saflaştırılarak karakterize edilmiş ve optimum pH'sı 6,0 olarak belirlenmiştir. Enzimin 6,0-9,0 pH aralığında 37 °C'de 1 saatten fazla stabil kalıp aktivitesini %90'dan fazla koruduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda saflaştırılan enzimin Hg^{2+} iyonu ile inhibe edildiği rapor edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Model
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
+4 Soğutucu	J.P. Selecta
BioLogic LP System	BioRad
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-ZHWY-2102C
Elektroforez Sistemi	BioRad Mini ReadySub-Cell™ ve Mini
Hassas Terazı	Shimadzu ATX 224
Işık Mikroskobu	ZEISS, Primo Star
Jel Görüntüleme Sistemi	BioRad ChemiDoc™MP
Magnetik Isıtıcı	Daihan, shr
Mikrobiyolojik Steril Kabin	ESCO NordicSafe™
Nanodrop Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan G
Otoklav	JSR, JSAC-60
PCR Cihazı	SensoQuest Thermocycler
pH Metre	OHAUS ST 3100F
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Spektrofotometre	Biotek EPOCH
Statik İnkübatör	Memmert IN110
Su Banyosu	Daihan
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Vorteks	WisdWisemix VM-10

3.1.2. Kullanılan izolatlar

Çalışmada kitinaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan tüm bakteriyel izolatlar ile *Fusarium oxysporium* izolatı, Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda önceki çalışmalardan izole edilerek tanımlanan kültürlerden oluşmaktadır (Gormez 2011). Biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*) ise Atatürk Üniversitesi Biyoçeşitlilik ve Uygulama Araştırma Merkezinden temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan kimyasallar, kitler ve çözeltiler

Çalışmada Akrilamid/Bis-akrilamid (Sigma-Aldrich, 30%), KH_2PO_4 (Sigma), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , ZnSO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Tween 80, Folin & Ciocalteu'nun Fenol Reaktifi, TEMED, Amonyum Persülfat (APS), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Tris, Glisin, 2-Mercaptoethanol, Bromo fenol Blue, Coomassie Brilliant Blue R-250, Metanol, Asetik Asit (glacial) 100%, Sodyum Asetat, DNS, N-Asetil-D-glukozamin, HCl, Na_2CO_3 , NaOH, Etanol, DMSO, EDTA, H_2O_2 , Triton X 100, Aseton, İsoopropanol, Gliserol, Taq DNA Polimeraz, dNTP, Sodyum asetat ve Potasyum fosfat kimyasalları ile EcoSpin Plazmit İzolasyon Kiti (Product Code: EcoPI-50x) kullanılmıştır.

Bakteri izolatlarının tanımlanması için kullanılan çözeltiler:

KOH Çözeltisi: %3 lük KOH çözeltisi hazırlamak için 3 g KOH tartılarak 100 ml distile su (dH_2O)'da çözüldü.

Amfisilin solüsyonu: Son konsantrasyon 20 mg/ml olacak şekilde 1 ml dH_2O ile hazırlanan solüsyon 0,22 μm çaplı milipor filtre kullanılarak steril edildi.

X-Gal solüsyonu: 40 mg X-Gal tartılıp 1ml dimetilformamid ile karıştırılarak hazırlandı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

IPTG solüsyonu: 23,8 mg IPTG, 1 ml dH₂O ile karıştırılarak hazırlanan solüsyon filtre yardımıyla steril edildi.

Lügol Solüsyonu: 0,5 g iyot ve 1 g KCl tartılıp, 40 ml dH₂O içerisinde çözöldükten sonra son hacim 50 ml'ye tamamlandı.

Kristal Viyole Solüsyonu: 2 g kristal viyole, %96'lık etanolde çözölüp üzerine 80 ml dH₂O eklenerek hazırlandı.

H₂O₂ çözeltisi: 3,5 ml H₂O₂'nin hacmi son hacim 50 ml ulaşınca kadar dH₂O eklenerek hazırlandı.

EDTA Tamponu (50mMpH 8,0): 0,73 g EDTA, 40 ml dH₂O içerisinde çözölüp 1 N HCl ve 1 N NaOH ile pH'sı 8,0'e ayarlandıktan sonra dH₂O eklenerek son hacim 50 ml'ye tamamlandı.

%70'lik Etanol: 35 ml etanol üzerine 15 ml dH₂O ilave edilerek hazırlandı.

Protein miktar tayininde kullanılan çözeltiiler

Solüsyon A: 2,86 g NaOH ve 14,30 g Na₂CO₃ tartılıp son hacim 500 ml olacak şekilde dH₂O eklenip karıştırılarak hazırlandı.

Solüsyon B: 1,42 g CuSO₄.5H₂O tartılıp 100 ml dH₂O içerisinde çözölerek hazırlandı.

Solüsyon C: 2,85 g C₄H₄Na₂O₆, 100ml dH₂O içerisinde çözölerek hazırlandı.

Folin Reagent: 5 ml Folin & Ciocalteu fenol reaktifi ve 6 ml dH₂O karıştırılarak hazırlandı.

Enzim aktivite tayini için kullanılan çözeltiler

DNS Çözeltisi: 35 ml saf su içerisine 0,5 g DNSA ve 15 g sodyum potasyum tartarat çözüldükten sonra 0,1 g fenol ve 0,025 g Na₂SO₃ eklendi. Farklı bir beherde 10 ml dH₂O da 0,8 g NaOH çözdürülerek hazırlanan karışım DNS içeren çözeltiye eklendi. Son olarak da hacmi dH₂O ile 50 ml olana kadar tamamlanarak çözelti hazırlandı.

Enzim saflaştırılmasında kullanılan çözeltiler

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 7,0): 45 mL saf suda 0,30 g Tris çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 7,0'ye ayarlandı ve son hacim dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı.

Fosfat Tamponu (50 mM, pH 7,0): 90 mL saf suda 0,68 g KH₂PO₄ çözüldü. pH'sı 7,0'ye ayarlanarak son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

SDS-PAGE için kullanılan çözelti ve tamponlar

Tris-HCl (1M pH 8,8): 6,05 g Tris tartılarak 45 ml dH₂O ilave edildi. 1 N HCl ile pH'sı 8,8'e ayarlandıktan sonra son hacim dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı.

Tris-HCl (1M pH 6,8): 6,05 g Tris tartılarak 45 ml dH₂O ilave edildi. 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlandıktan sonra son hacim dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı.

APS Çözeltisi (%10): 1 g amonyum persülfat üzerine 9 ml dH₂O eklenerek hazırlandı.

Yürütme Tamponu: 6 g Tris, 28,8 g glisin üzerine 20 ml %10'luk SDS eklendi. Son hacim dH₂O ile 2000 ml'ye tamamlandıktan sonra pH 8,3'e ayarlandı.

Numune Tamponu: 325 µL Tris-HCl (1M pH 6,8) üzerine 50 µL %10'luk SDS, 500 µL gliserin ve 500 µL %1'lik Bromfenol mavisi eklendikten sonra çözeltinin son hacmi 5 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu karışım -20 °C'de muhafaza edildi. SDS-PAGE için

3. MATERYAL ve YÖNTEM

kullanılacak tamponun içerisine ise 250 µL β-Merkaptoetanol eklenerek kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

Boyama çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue (%0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250), 150 ml etanol, 50 ml asetik asit ve 300 ml dH₂O karıştırılarak hazırlandı.

Yıkama çözeltisi: 50 ml asetik asit, 150 ml etanol ve 300 ml dH₂O karıştırılarak hazırlandı.

Enzim karakterizasyonunda kullanılan çözeltiler

Asetat Tamponu (50 mM, pH 4,0): 45 ml saf suda, 0,205 g sodyum asetat çözüldü. 1N asetik asit ile pH’sı 4,0’e ayarlanarak son hacim dH₂O ile 50 ml’ye tamamlandı.

Fosfat Tamponu (50 mM, pH 6,0): 90 ml dH₂O içerisinde 0,68 g KH₂PO₄ çözüldü. pH’sı 7,0’ye ayarlandı ve son hacim dH₂O ile 100 mL’ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0) 45 ml dH₂O içerisinde 0,30 g Tris çözüldü. 1 N HCl ile pH’sı 8,0’e ayarlandı ve son hacim dH₂O ile 50 mL’ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 7,0): 45 ml dH₂O içerisinde 0,30 g Tris çözüldü. 1 N HCl ile pH’sı 7,0’e ayarlandı ve son hacim dH₂O ile 50 mL’ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 10,0): 45 ml dH₂O içerisinde 0,187 g glisin çözüldü. 1 N NaOH ile pH’sı 10,0’a ayarlandı ve son hacim dH₂O ile 50 mL’ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 9,0): 45 ml dH₂O içerisinde 0,187 g glisin çözüldü. 1 N NaOH ile pH’sı 9,0’a ayarlandı ve son hacim dH₂O ile 50 mL’ye tamamlandı.

Kullanılan besiyerleri

Nutrient Agar (NA) (Sigma) (Bileşeni-g/L; Agar: 12,0, Peptone: 5,0, Beef Extract: 3,0, Sodium Chloride: 8,0): 1000 ml dH₂O içerisine 28 g Nutrient Agar karışımı ilave edilerek hazırlandı.

Nutrient Broth (NB) (Sigma) (Bileşeni-g/L; Beef Extract: 1,0, Yeast Extract: 2,0, Peptone: 5,0, Sodium Chloride: 5,0): 1000 ml dH₂O içerisine 13 g Nutrient Broth karışımı ilave edilerek hazırlandı.

Luria Bertani Broth (LB) (Bileşeni-g/L; Tryptone: 10,0, Yeast Extract: 5,0, Sodium Chloride: 10,0): 1000 ml dH₂O içerisine 20 g LB besiyeri ilave edilerek hazırlandı.

Kitinaz aktivitesi belirleme agarı (KABA): 4,5 g koloidal kitin, 0,3 g MgSO₄.7H₂O, 3,0 g (NH₄)SO₄, 2,0 g KH₂PO₄, 1,0 g sitrik asit monohidrat, 15 g agar ve 200 µl Tween-80, 1000 ml dH₂O içinde karıştırılarak pH 6,0'ya ayarlandıktan sonra, 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilip kullanıldı (Agrawal et al. 2011).

Sıvı kültürde kitinaz aktivitesi belirleme besiyeri (KABB): 3 g (NH₄)₂SO₄, 0,3 g NaH₂PO₄, 2 g KH₂PO₄, 0,3 g MgSO₄.7H₂O, 0,02 g FeSO₄.7H₂O, 0,016g MnSO₄, 0,014g ZnSO₄, 0,02g CaCl₂.2H₂O, 200 µl Tween 80 ve tek karbon kaynağı olarak 10 g koloidal kitin, 1000 ml saf su içinde karıştırılarak pH 5,0'e ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilip kullanıldı.

Amilaz Besiyeri: 20 g Nutrient agar, 5 g çözünebilir nişasta, 15 g agar, 1000 ml dH₂O içerisinde çözdürülerek 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilip kullanıldı (Akdaş 2012).

Proteaz Besiyeri: 20 g Nutrient agar, 1000 ml dH₂O içerisinde çözüldü. 121 °C'de 15 dk otoklav yapıldıktan sonra besiyerinin sıcaklığı 50 °C'ye düştüğünde 10 g yağsız süt tozu eklenerek hazırlandı (Akdaş 2012).

Patates Dekstroz Agar Besiyeri (PDA) (Bileşimi g/L; Glukoz 20 g, Agar 15 g, Potato infusion 4 g): Ticari olarak satın alınan besiyerinden 39 g tartılıp 1000 ml dH₂O içerisinde çözüldü. 121 °C’de 15 dk otoklavda steril edilerek kullanıldı (Yılmaz 2019).

3.2. Yöntem

3.2.1. Kolloidal kitinin hazırlanması

Besiyerlerinin hazırlanması ve aktivite ölçümü için kullanılacak olan kolloidal kitin Priya et al. (2011)’in önerdiği metodun modifiye edilmesi ile hazırlandı. Bunun için; 10 g toz kitin 100 ml konsantre HCl üzerine eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde bir gece bekletildi. Bekletilen kitin üzerine 400 ml 4 °C’ye kadar soğutulmuş %96’lık etanol eklendi ve bir gece 4 °C’de buzdolabında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda 5000 rpm’de 20 dk santrifüj edilerek altta kalan pelet alınıp pH 7,0 oluncaya kadar saf su ile yıkandı. Elde edilen koloidal kitin, sabit ağırlığa gelinceye kadar 50 °C’ye ayarlanmış fırında kurutularak oda sıcaklığında muhafaza edildi (Priya et al. 2011).

3.2.2. Kitinaz aktivitesi olan izolatların belirlenmesi

a. Katı besi ortamında kitinaz aktivitesinin belirlenmesi

Kültür koleksiyonunda bulunan izolatlar ilk olarak NA katı besiyerine çizgi ekim yapılarak 24 saat 30 °C’de inkübe edildi. Gelişen izolatların tek kolonilerinden karbon kaynağı olarak %1 lik kolloidal kitin içeren KABA besiyerine ekimleri yapıldı. 72 saat 30 °C de inkübasyona bırakılan izolatlardan besiyerinde şeffaf zon oluşturanların kitinaz aktivitesi pozitif olarak belirlendi ve tekrar KABA besiyerlerine ekimleri yapıldı. Bu besi ortamında da 72 saat 30 °C de inkübe edilen ve zon çapı diğerlerine göre daha büyük olan izolatlar seçilerek sonraki çalışmalarda kullanıldı (Priya et al. 2011).

b. Sıvı kültürde kitinaz aktivitesinin belirlenmesi

KABA besiyerinde zon veren izolatların karbon kaynağı olarak %1 lik koloidal kitin içeren KABB sıvı besiyerine ekimleri yapıldı. 72 saat 30°C de çalkalamalı inkübatöre bırakılan kültürler inkübasyon süresi sonunda 5000 rpm de santrifüj edildi ve fermantasyon sıvısından kitinaz aktivitesine bakıldı. Kitinaz aktivitesi yüksek olarak belirlenen izolat ile çalışmalara devam edildi.

c. DNS yöntemiyle indirgen şeker tayini (Aktivite ölçümü)

DNS yöntemiyle aktivite ölçümünde aşağıda verilen işlem sırası takip edilmiştir.

- Örnek tüplerine 500 µL substrat olarak 0.1 M fosfat tamponu (pH 7,0) içindeki %2'lik koloidal kitin konuldu.
- Üzerine 500 µL enzim içeren örnek eklendi ve tüpler 30 °C'deki su banyosunda 30 dakika bekletildi.
- Su banyosundan çıkarılan ve oda sıcaklığına ulaşan tüm tüplere 1 ml DNS çözeltisi eklendi.
- Tüpler 10 dakika kaynar su banyosunda bekletildi ve spektrofotometrede 540 nm'de kör numuneye karşı örneklerin absorbanları ölçüldü.
- Örneklerdeki indirgen şeker miktarını hesaplamak için örnek çözeltilerinin absorbanları, N-asetilglukozamin standart eğrisi ile hesaplandı.
- Örneklerdeki N-asetilglukozamin miktarı mg/ml olarak tespit edildi (McCreath and Gooday 1992; Ramirez et al. 2003).

Kitinaz enziminin ünite birimi; dakikada 1 µmol şeker açığa çıkaran enzim miktarı olarak belirlendi, standart olarak GlcNAc kullanıldı. Enzim ünitesi ve spesifik enzim aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Yan and Fong 2018).

$$\text{EU/ml} = \text{Xmg NAG} \times 1\text{g}/1000\text{mg} \times 1\text{ mol}/221\text{g} \times 1000000\text{ }\mu\text{mol}/\text{mol} \times 1/30\text{dk} \times 1/0,5\text{ ml}$$
$$(\text{EU/ml} = \text{Xmg NAG} \times 0,3)$$

Spesifik enzim aktivitesi= total enzim ünitesi (EU/ml) /toplam protein miktarı(mg)

d. Protein miktar tayini

Protein miktar tayini için Lowry metodu kullanıldı. Bu amaçla hazırlanan örneklerden cam tüp içerisine 0,5 ml konularak üzerine lowry solüsyonu eklendi. Vorteksle karıştırılıp 20 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda cam tüpe yeni hazırlanmış 0,1 ml Folin reaktifi eklenerek vortekslendi ve karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dk bekletilen örneklerin spektrofotometrede (750 nm dalga boyunda) ölçümleri yapıldı. Örneklerdeki protein miktar tayini için BSA standart grafiğinden yararlanıldı (Lowry 1951).

3.3. Kitinaz Aktivitesi Gözlenen İzolatın Morfolojik Özelliklerinin Araştırılması

3.3.1. Hücre morfolojilerinin belirlenmesi

İzolatın hücre morfolojisinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak boyama yapıldı. Bu amaçla katı besiyerinde 24 saat 30 °C’de büyütülen kültürden öze yardımıyla alınıp lam üzerine yayıldı ve kuruması beklendi. Lam üzerine fikse edilen kültür, kristal viyole boyası ile 3-4 dk muamele edildikten sonra saf su ile yıkanıp kurutularak mikroskop altında incelendi (Rüzgar 2019).

3.3.2. KOH testi

İzolatın, Gram özelliklerinin belirlenmesi amacıyla KOH testi yapıldı. Bu amaçla NA besiyerinde geliştirilen taze kültürün üzerine %3'lük KOH çözeltisi eklendi ve özeyle karıştırılarak öze hafifçe yukarı doğru kaldırıldı. Gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan dış zar KOH ile etkileşime girdiğinde lizis olup hücre duvarının yapısı bozulduğundan görülen viskozite KOH pozitif (+), viskoz yapının ve dolayısıyla uzamanın görülmediği durum ise KOH negatif (-), Gram (+) olarak değerlendirildi (Rüzgar 2019).

3.3.3. Hareketlilik testi

Bakteri izolatının hareketli olup olmadığını tespit etmek amacıyla asılı damla preparatı yapıldı. Bu amaçla bakteriyel kültürden az bir miktar alınarak lamelin ortasına konuldu ve üzerine çukur lam kapatıldı. Lam ters çevrilerek lamelin üste gelmesi sağlandı ve asılı damla preparatı yapılarak mikroskopta incelendi (Saygılı 1995).

3.4. Kitinaz Aktivitesi Gözlenen İzolatın Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.4.1. İzolatın gelişim gösterebildiği sıcaklık aralığının belirlenmesi

Bakteri izolatının gelişebildiği minimum, optimum ve maksimum sıcaklık değerlerinin bulunması için NB sıvı besi ortamı kullanıldı. Bu amaçla besi ortamlarına inokule edilen izolatlar 48 saat boyunca 10 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C ve 60 °C’de inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrik ölçümler (OD₆₀₀) yapılarak izolatın gelişim gösterdiği sıcaklık değerleri tespit edildi (Rüzgar 2019).

3.4.2. İzolatın gelişim gösterdiği pH aralığının belirlenmesi

Bakteri izolatının gelişim gösterdiği minimum, optimum ve maksimum pH değerlerinin belirlenmesi için farklı pH değerlerinde (3,0, 5,0, 7,0, 9,0, 11,0) NB sıvı besi yerlerine bakteri inokülasyonu yapıldı ve çalkalamalı inkübatörde 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda spektrofotometrik ölçümler yapılarak izolatın gelişim gösterdiği pH aralıkları belirlendi (Arslan 2017).

3.4.3. İzolatın gelişim gösterdiği tuz konsantrasyonunun belirlenmesi

Bakteri izolatının gelişebildiği tuz aralığının belirlenebilmesi için farklı tuz konsantrasyonlarında (%2, %4, %6, %8, %10 ve %12’lik) hazırlanan NB besiyerlerine inokülasyonlar yapıldı ve tüpler çalkalamalı inkübatörde 24-48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda spektrofotometrik ölçümler yapılarak izolatın gelişim gösterdiği tuz konsantrasyon değerleri tespit edildi (Özkan 2015).

3.5. Kitinaz Aktivitesi Gözlenen İzolatın Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.5.1. Katalaz testi

Katalaz enzimi elektron transfer zincirinin sonunda oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2)'i parçalayarak H_2O ve O_2 gazının oluşumuna neden olur. Reaksiyon sonucunda ortaya çıkan O_2 gazı kabarcıklar halinde görülür. Bu amaçla NA'da geliştirilen 48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu alınıp lam üzerine konuldu ve bir damla %3'lük H_2O_2 damlatıldı. Kabarcık oluşumu gözlenenler pozitif, diğerleri negatif olarak değerlendirildi (Adıgüzel 2006).

3.5.2. Amilaz testi

Bakteri izolatının, %1 oranında nişasta içeren NA besi ortamına ekimi yapılarak 3 gün 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında petrilere, lügol çözeltisi eklenilerek ekim çizgisi etrafında zon görülenler pozitif olarak değerlendirildi (Yılmaz 2019).

3.5.3. Proteaz testi

Bakteri izolatının, %10 yağsız süt tozu içeren besi ortamına ekimi yapılarak 3 gün boyunca 30 °C de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda gelişen bakteri izolatının etrafında oluşan zona göre test sonucu pozitif olarak değerlendirildi (Sarı 2016).

3.5.4. Hemoliz testi

Bakteri izolatının, 18-24 saatlik kültürü kanlı agara ekim yapılarak 24-48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonucunda ekim çizgisinin etrafında zon oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (Kuzu 2008).

3.6. Kitinaz Aktivitesi Gözlenen İzolatın Moleküler Olarak Tanınması

3.6.1. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

a. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu amacıyla kitin aktivitesi gösteren izolat, NA besiyerinde 30 °C’de 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda tek koloni alınarak 3 ml LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve 24 saat süreyle 30°C’lik çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Gelişen izolattan DNA izolasyonu için aşağıdaki işlem sırası takip edildi.

- Bakteri sıvı kültürü 3 dk boyunca 13.500 rpm de santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı, peletin üzerine 1 ml lizis tamponu eklendi.
- 30 dk 50 1/sn homojenizatörde hücreler parçalandı.
- 12.000 rpm de 10 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant yeni tüpe alındı.
- Üzerine 2 µl RNaz eklenerek 37 °C’de 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- Üzerine eşit hacimde fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisinden eklenip 12.000 rpm de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra üst kısım alınarak eşit hacimde üzerine %100 etanol eklendi.
- 1 saat -20 °C’de inkübasyona bırakıldı.
- 12.000 rpm de +4 °C’de 10 dk santrifüj yapıldı.
- Üst kısım atılıp 1 ml %70’lik etanol eklendi, 12.000 rpm de +4 °C’de 10 dk santrifüj yapıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandı.
- Son olarak pelet havada kurutuldu ve 1xTE tamponda muhafaza edildi (Görmez 2011).

b. DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi

DNA konsantrasyonunun tespiti amacıyla 2 µl TE tampon içerisindeki genetik materyalin 260 nm’de absorbansı alındı. Saflığını analiz etmek amacıyla da 280 nm’de absorbansı ölçülerek protein kirliliğinin olup olmadığı tespit edildi. A_{260} ve A_{280} değerlerinin oranına bakılarak DNA’nın kullanılabilirliğine karar verildi (Rüzgar 2019).

c. Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

1,0 g agaroz 100 ml 1X TAE tamponu içerisinde mikrodalga fırın yardımıyla çözüldü. Sıcaklığı düşünce çözelti içerisine, konsantrasyonu 0,5 µg/ml olan ethidium bromür eklendi. Hazırlanan jel karışımı elektroforez küvetine dökülerek 30 dk boyunca jelin katılaşması beklenildi. Taraklar çıkarılıp, 1X TAE tamponu ihtiva eden elektroforez tankına alındı. 1 kb DNA markırı (HyperLadder 1kb, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10037 bp) ilk kuyucuğa, 3 µl DNA örneği 2,0 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak diğer kuyucuklara yüklendi. Düzenek, 90 voltta 50 dk yürütüldü. İşlem sonunda oluşan DNA bantları görüntülendi ve analiz edildi (Görmez 2011).

d. 16S rRNA gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

16S rRNA gen bölgesi, evrimsel açıdan korunmuş bölgedir ve bakteri sistematigi için oldukça önemlidir. Bu amaçla 30 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı (Çizelge 3.2.) ve evrensel primerler kullanılarak *in vitro* koşullar altında hedeflenen gen bölgesi PCR yardımı ile çoğaltıldı.

Çizelge 3.2. PCR Reaksiyon Karışımı

REAKTİF	MİKTAR(µl)
10X PCR tamponu	3
dNTP mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 mM)	0,6
Forward; 27F=5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC	3
Reverse; 1492R=5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	3
DMSO	1,2
MgCl ₂	1,8
5 unit/µl Taq DNA polimeraz	0,3
dH ₂ O	12,1
Template DNA	5

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Hazırlanan reaksiyon karışımı Çizelge 3.3' de verilen protokole göre dizayn edilerek 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu yapıldı (Görmez 2011).

Çizelge 3.3. 16S rRNA PCR Programı

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	
Bağlanma	50	1	36
Uzama	72	2	
Son Uzama	72	5	1

e. 16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi

PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla hazırlanan %1'lik agoroz jelin ilk kuyucuğuna 1 kb DNA markırı, diğer kuyucuğuna da PCR ürünü (5 µl PCR ürünü + 2,0 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak) yüklendi. Örnekler 90 voltta 50 dk yürütüldü ve görüntülendi.

f. 16S rRNA PCR ürünlerinin kompetant *E. coli* hücrelerine klonlanması

Çalışmada kompetant hücre yapımında *E.coli* JM101 straini kullanıldı. Ön kültürü hazırlanan izolat LB besi ortamına alınarak istenilen konsantrasyona (0,4-0,6 OD₆₀₀) ulaşmaya kadar geliştirildi. Kompetant hale getirilmek için hücreler çöktürülerek CaCl₂ ile muamele edildi.

g. Ligasyon basamağı

PCR ile çoğaltılan gen bölgeleri pGEM®-T Easy (Promega) vektörüne aktarıldı. Steril bir tüpte Çizelge 3.4'de verilen miktarlarda reaktifler karıştırılıp spin edilerek PCR

cihazında 16 °C'de 13-15 saat bekletildi. Transformasyon yapılmaya kadar +4 °C'de saklandı (Tarakçıoğlu 2016).

Çizelge 3.4. Ligasyon Reaktifleri ve Kullanılan Miktarları

Reaktif	Kullanılan Miktar (µl)
Ligasyon Buffer 2X	5
PCR ürünü	3
Vektör	1
T4 DNA Ligaz	1

h. Transformasyon işlemi

Transformasyon işlemi için ısı-şok metodu kullanıldı. Bu amaçla hazırlanmış kompetent hücrelerden 200 µL alınıp buzda bekletildi. Isı bloğu 42 °C'ye ayarlandı ve kompetent hücreler 2 dk 42 °C de bekletilerek ısı şokuna uğratıldı. Isı şokuna uğrayan kompetent hücreler ile ligasyon ürünü aynı tüpte birleştirildi. Buz üzerinde 30 dk bekletildi. Karışım buzdan yavaşça alınıp 42 °C'de 2 dk tutuldu. Üzerine LB Broth sıvı besiyerinden 200 µL konulup 1 saat 40 dk, 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Amfisilinli katı besiyeri hazırlandı ve steril kabin içerisinde 40 µL X-Gal ve 40 µL IPTG karıştırılıp petrilere yayıldı. İnkübasyona bırakılmış olan kompetent + ligasyon ürününden 150 µl alınarak, Amfisilin + X-gal + IPTG içeren LB agar besiyerine yayma ekim yapıldı ve 37 °C'de 12-14 saat inkübe edildi (Sarı 2016).

ı. Kolonilerin seçilmesi ve sıvı kültüre alınması

37 °C'de inkübasyona bırakılan petrilere 14 saat sonra +4 °C'ye alındı. Mavi beyaz koloni oluşumu gözlemlendikten sonra, steril pipet ucuyla beyaz kolonilerden alınıp amfisilin içeren 5 ml LB broth sıvı besiyerine koloniler aktarıldı. 37 °C'de çalkalayıcı inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakıldı (Rüzgar 2019).

i. Koloni PCR

Seçilen beyaz kolonilerden doğru klonu taşıyanları seçmek amacıyla koloni PCR yapıldı. Bu amaçla izelge 3.5’deki reaktiflerden bir karışım hazırlandı ve içine seçilen beyaz koloniler inokule edildi. PCR reaksiyonun sonucunda jel elektroferezi yapıldı ve görüntü alındı. Seçilen koloniler plazmit izalasyonu için amfisilinli sıvı LB besiyerine aktarıldı.

Çizelge 3.5. Koloni PCR Reaksiyon Karışımı

Reaktif	Kullanılan Miktar (L)
dH ₂ O	16,1
10X PCR buffer	3
dNTP	0,6
MgCl ₂	1,8
T7 primer (5’-AATACGACTCACTATAG–3’)	1
SP6 primer (5’– ATTTAGGTGACACTATAG–3’)	1
DMSO	1,2
Taq DNA polimeraz	0,3

j. Plazmid izolasyonu

37 C’de 16 saat amfisilinli sıvı LB besiyerinde inkübasyona bırakılan kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmit izolasyonu amacıyla EcoSpin Plazmid izolasyonu kiti kullanıldı ve aşağıdaki işlem basamakları geekleştirildi.

- Kültür 6000 rpm de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet zerine 250 l EcoSpin Resuspension solüsyonu eklendi ve pipetaj yapılıp üzerine 20 l of EcoSpin RNaz A ilave edildi.
- 250 l EcoSpin lizis solüsyonu eklenip tp alt st yapılarak karıştırıldı. 3 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

- 350 µl EcoSpin yükleme solüsyonu eklendi ve alt üst yapılarak karıştırıldı ve 5 dk 12.000 rpm de oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- EcoSpin Column'lara aktarılarak 30 sn santrifüj edildi. Alt kısımdaki sıvı atıldı ve kolona 400 µl EcoSpin yıkama solüsyonu eklenerek 30 sn santrifüj edildi.
- Alt kısma geçen sıvı atıldı ve 500 µl EcoSpin yıkama solüsyonu 2 eklenip 30 sn santrifüj edildi.
- Altta biriken sıvı tekrar atılıp 200 µl EcoSpin yıkama solüsyonu 2 eklenip 2 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir tüpe aktarılarak 30-50 µl EcoSpin elüsyon solüsyonu eklendi. 1 dk beklendikten sonra 30 sn santrifüj edildi. Son olarak kolon çıkartılıp atıldı ve saflaştırılmış plazmitler -20 °C de saklandı.

k. Plazmit konsantrasyonunun belirlenmesi

2 µL plazmitin köre karşı 260 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümü yapıldı ve plazmit konsantrasyonu 100-200 ng olacak şekilde ayarlandı. Konsantrasyonu ayarlanan plazmitin sekans analizi için MacroGen (Hollanda) firmasından hizmet alımı gerçekleştirildi.

3.6.2. Klonlanan dizilerin analizi ve izolatın tanılanması

DNA dizi analizi sekans sonuçları, BioEdit programı ile analiz edildi ve FASTA formatına çevirildi. Sekans dizileri ortak bölgelerinden karşılaştırılarak, yaklaşık 1443 bp'lik dizi elde edildi. Elde edilen sekans verisi sonucu genbank'daki verilerle (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch) karşılaştırılarak izolatın tür seviyesinde tanısı gerçekleştirildi.

3.7. Kitinaz Enziminin Saflaştırılması

3.7.1. Santrifüjleme

Enzim saflaştırmasının ilk basamağında santrifügasyon işlemi gerçekleştirildi. Fermantasyon sıvısındaki hücrelerin ve büyük partiküllerin uzaklaştırılması için 5000 rpm’de 20 dk santrifüjle çöktürme yapıldı. Enzimin denatüre olmasının önüne geçmek için santrifüj cihazı +4 °C’ye ayarlanarak kullanıldı (Kuzu 2008).

3.7.2. Amonyum sülfat çöktürmesi

Saflaştırma yöntemleri arasında yaygın olarak kullanılan nötral tuzlarla çöktürme yönteminde çoğunlukla amonyum sülfat tuzunun kullanılmasının sebebi, suda iyi çözünür olması, su molekülleri ile etkileşime girme yeteneğinin fazla olması ve ekonomik olmasıdır. Amonyum sülfat konsantrasyonlarında yüklü iyonlar su moleküllerine bağlanmak için proteinlerle yarışmakta ve bu yarış sonucunda su moleküllerine proteinler yerine tuz molekülleri bağlanarak, bu olay proteinlerin çökmesi ile sonuçlanmaktadır. Amonyum sülfat kullanılarak çöktürme işleminde proteinlerin denatürasyonu değil yalnızca proteinlerin sudaki çözünürlüğünün azaltılıp çökmeleri (salting out) sağlanmaktadır (Yılmaz 2019). Bu amaçla yapılan çöktürme işleminde fermantasyon sıvısı 4 °C’de, 10000 rpm’de 20 dk santrifüj edilerek hücreler ve büyük partiküller uzaklaştırıldı. Elde edilen supernatant %20 ile %60 arası doyumlukta amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) çözeltileri ile karıştırılarak fraksiyonlara ayrıldı. Amonyum sülfat yavaş yavaş eklenerek karıştırıldıktan sonra 4°C’de bir gece bekletilip, her bir fraksiyon için aktivite tayini yapıldı. Aktivite tayini sonucunda en yüksek aktivitenin görüldüğü amonyum sülfat konsantrasyonu çöktürme işlemlerinde kullanıldı.

$$G \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 = 1,77 \times V \times (S_2 - S_1) / (3,54 - S_2)$$

G (NH₄)₂SO₄: Eklenmesi gereken katı amonyum sülfat tuzunun gram miktarı

V: Enzim çözeltisinin (supernatant) hacmi

S₁: Başlangıçtaki amonyum sülfat doyumluğu

S₂: İstenen amonyum sülfat doyumluğu (Çiftçi vd 2004).

3.7.3. Diyaliz

Diyaliz, tuz ile çöktürme işlemi yapıldıktan sonra fazla tuzu ve diğer istenmeyen molekülleri uzaklaştırmak için kullanılan yöntemdir. Diyaliz torbası yarı geçirgen özellikte ve belirli büyüklükte gözenekleri olan bir membrandır. Bu işlem uygun pH'da tamponlarla gerçekleştirilmekte ve osmoz olayı sayesinde su diyaliz torbasının içine girerken iyonlar ve tuzlar tampon çözelti ortamına geçmektedir. Bu amaçla tuzla çöktürme işleminden sonra çöken proteinler pH 7,0, 50 mM Tris-HCl tamponu ile çözülüp diyaliz torbasına alındı ve aynı tampon içerisinde, 4 °C'de tampon en az üç kez değiştirilerek diyaliz işlemi gerçekleştirildi (Yayalar 2019).

3.7.4. İyon değişim kromatografisi

İleri saflaştırma yöntemlerinden biri olan iyon değişimi kromatografisi hem yeni proteinlerin keşfi hem de yüksek oranda saflaştırma amacıyla kullanılmaktadır. Bu kromatografi yönteminde kolon dolgu maddesi ile saflaştırılmak istenen örnek arasında iyonik bir etkileşim söz konusudur. (Jungbauer et al. 2009). Proteinler karakteristik izoelektrik noktalarında (pI) net yükleri sıfırdır. Bir protein izoelektrik noktasına göre daha asidik bir ortamda bulunursa pozitif yüke, izoelektrik noktasından daha alkali bir ortamda bulunursa negatif yüke sahip olur. İyon değişim kromatografisinde, protein molekülleri spesifik bir pH ve tuz konsantrasyonunda kolon dolgu maddesine iyonik etkileşimler ile bağlanmaktadır. Kolon dolgu maddesine bağlanan proteinlerin artan tuz konsantrasyonu, pH ya da ikiside kullanılarak kolondan yavaş yavaş ayrışmaları sağlanmaktadır (Gallagher and Wiley 2008).

Çalışmada enzimin saflaştırılması amacıyla Bio-Rad Biological LP sistemi kullanıldı. Bu amaçla; diyalizden geçirilen protein çözeltisi santrifüj edilerek konsantre hale getirildi ve 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile dengelenmiş HiPrep Q XL 16/10 kolonuna yüklendi. 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) içinde hazırlanan lineer NaCl gradient (0-1 M) solüsyonu ile beraber kolondan geçirilerek fraksiyon tüplerine toplandı. Kolondan alınan her bir fraksiyon tüpündeki örnek aktivite testlerine tabii tutularak protein miktar tayinleri gerçekleştirildi. Aktivite görülen tüpler birleştirilerek santrifüj edildi ve konsantre hale getirilen örnekler içerisindeki tuzların uzaklaştırılması amacıyla

HiPrep™ 26/10 Desalting kolonuna yüklendi. Kolona yüklenen örnekler 0-1.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradient solüsyonu ile kolondan geçirildi ve kullanılıncaya kadar -20 °C de muhafaza edildi.

3.8. Saflaştırılan Enzimin Karakterizasyonu

3.8.1. Enzimin molekül ağırlığının belirlenmesi

SDS-PAGE, proteinlerin molekül ağırlığının tespit edilmesi amacıyla yüklü moleküllerin elektriksel alanda ayırımına dayanan bir elektroforez tekniğidir. Bu amaçla kullanılacak olan tüm elektroforez malzemeleri distile su ile iyice temizlenerek kalın ve ince cam, kısıkaçlarla birleştirilip jel hazırlama kabine sabitlendi. İlk olarak ayırma jeli (%15'lik akrilamid içeren) hazırlanıp hızlıca iki cam plakanın arasına döküldü. Jel üzerinde oluşan hava kabarcıklarını engellemek için jel üzerine izopropanol eklenerek polimerleşmeyi sağlamak amacıyla 30 dk bekletildi. Jel üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldıktan sonra yükleme jeli (örneklerin yükleneceği jel) hazırlanıp ayırma jelinin üzerine döküldü ve taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirildi (Çizelge 3.6). Hazırlanan jel polimerleşmenin gerçekleşmesi için 30 dk bekletildi ve jel üzerindeki, taraklar yavaşça çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi. Jele yüklenecek ham enzim ekstraktı, kısmi saflaştırma örneği ve kolondan alınan saflaştırılmış enzim örneklerinin her birisi ayrı eppendorf tüplerinde numune çözeltisiyle karıştırılarak 90°C'de 5 dk süre ile bekletildi ve denatüre olmaları sağlandı. Örnekler kuyulara yüklendikten sonra 60 voltta 30 dk yürütüldü. Akabinde ayırma jeline geçen örnekler 120 voltta 90 dk yeniden yürütüldü. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel boyama işlemine tabii tutularak görüntülendi (Üstün 2019).

Jelin görüntülenmesi

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel 60 dk boyunca Coomassie R-250 boyası ile muamele edildi ve yıkama solüsyonunda 1 saat bekletildi. Protein bantları görünür hale gelinceye kadar yıkama işlemi tekrarlandı.

Çizelge 3.6. SDS-PAGE Jel Bileşenleri

Kimyasallar	Ayırma Jeli	Yığma Jeli
ddH ₂ O	2,8ml	3,6ml
%30 Akrilamid/bisakrilamid	5ml	670 µL
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	625µL
1,0 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,95ml	-
%10 PER	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5µL
%10 SDS	100 µL	50 µL

3.8.2. Kitinaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan kitinaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için farklı sıcaklık değerlerinde (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C’de) enzim aktiviteleri ölçüldü. Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi amacıyla da enzim örnekleri 100 mM, pH 7,0 fosfat tamponu ile (1:1 oranda) optimum sıcaklık değerinde, farklı sürelerde (20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dk) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda numunelerin enzim aktiviteleri ölçülerek enzim üniteleri hesaplandı.

3.8.3. Kitinaz enziminin optimum pH’sının ve pHstabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan kitinaz enziminin optimum pH’sının belirlenmesi için farklı pH değerlerinde (50 mM sodyum asetat (pH 4,0-5,0), potasyum fosfat (pH 6,0), Tris-HCl (pH 7,0-8,0), glisin-NaOH (pH 9,0-10,0) enzim aktiviteleri ölçüldü. pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla, enzim örnekleri 50 mM, pH 4,0-10,0 değerlerindeki farklı tamponlarla (sodyum asetat (pH 4,0-5,0), potasyum fosfat (pH 6,0), Tris-HCl (pH 7,0-8,0), glisin-NaOH (pH 9,0-10,0) 1:1 oranında 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda enzim aktiviteleri ölçülerek enzim ünite değerleri hesaplandı.

3.8.4. Metal iyonlarının kitinaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Metal iyonlarının kitinaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için, Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının fosfat tamponu (100 mM, pH 7,0) ile 1 ve 5 mM'lık çözeltileri hazırlandı. Enzim ve metal iyonlarının çözeltileri 1:1 oranda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek enzim aktiviteleri ölçüldü ve kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplandı.

3.8.5. Çeşitli reaktiflerin kitinaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi

50 mM, pH 8,0 Tris-HCl tamponu içerisinde %1 ve %5 (w/v) EDTA, (v/v) H_2O_2 , (w/v) SDS ve (v/v) Tween 20 ve Tween 80'nin çözeltileri hazırlandı. Saf enzim örnekleri bu çözeltilerin içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrası kitinaz aktiviteleri ölçülerek, kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplandı.

3.8.6. Çeşitli organik çözücülerin kitinaz enzimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Organik çözücülerin kitinaz aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için %5-%15 (v/v) konsantrasyondaki DMSO, aseton, gliserol, etanol, izopropanol çözeltileri kitinaz enzimi ile karıştırılarak 30 °C'de, 150 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kitinaz aktiviteleri ölçüldü ve kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplandı.

3.8.7. Kitinaz enzim reaksiyonuna ait K_m ve V_{max} kinetik sabitlerinin belirlenmesi

Saflaştırılan kitinaz enziminin kinetik sabitlerinin belirlenmesi amacıyla 0,1-5mM konsantrasyon aralığında enzimin substratı olan koloidal kitin kullanıldı ve 1/S (substrat, koloidal kitin, mg/ml) değerine karşılık 1/V (reaksiyon hızı, E.U/ml) değeri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Elde edilen grafikten K_m ve V_{max} (maksimum hız) değerleri hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934).

3.9. Kitinaz Enziminin Biyoteknolojik Uygulamaları

3.9.1. Kitinaz enziminin antifungal aktivitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan kitinaz enziminin antifungal aktivitesinin tespiti amacıyla, 20 µl enzim emdirilen diskler, *F. oxysporum*'un 1,5 cm uzağına konularak 5 gün boyunca fungusun gelişimi gözlemlendi ve sonuçlar kaydedildi. Antifungal aktivitesi gözlenen enzimin, spor çimlenmesi ve hif büyümesi üzerine etkileri değerlendirildi.

a. Enzimin spor çimlenmesi üzerine etkilerinin belirlenmesi

İlk olarak çalışmada kullanılan *F. oxysporum*'un spor çözeltisi hazırlandı. Bu amaçla PDA besi ortamına inokule edilen izolat 28 °C'de 5 gün sporlanması için inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 50 ml'lik steril %0,1'lik Tween 80 çözeltisi ile fungus sporları süspansiyon hale getirilerek bu süspansiyondan 9 ml, %0,1 lik Tween 80 içeren tüplerde 10^{-2} 'lik seyreltmeler hazırlandı. Bu seyreltmelerden Thoma lamı ile sayım yapılarak stok çözeltinin mililitresindeki spor sayısı belirlendi. Akabinde 6×10^3 spor/ml fungus spor çözeltisinden 0,5 ml alınıp 0,5 ml patates dekstroz broth ve 0,5 ml enzim preparasyonu bir eppendorf tüpünde karıştırılarak ve 28°C'de 150 rpm'de inkübe edildi. Kontrol olarak fermentasyon sıvısı yerine steril su kullanıldı. Her bir izolat için hazırlanan spor solüsyonu karışımı ve kontrol karışımlarından 6, 8, 10, 12 ve 24. saatlerde örnek alınıp fungus sporlarının çimlenmeleri mikroskop altında (10X40) incelendi. Uygulama sonucunda çimlenen ve çimlenmeyen spor sayıları belirlenerek görüntüler kaydedildi.

b. Enzimin hif büyümesi üzerine etkilerinin belirlenmesi

Fungus spor çözeltisinden (10^5 spor/ml) 1 ml alınıp PDA besi ortamı üzerine ekim yapılarak hazırlanan kültürler 28 °C'de inkübe edildi. 24 saat sonra, kitinaz içeren diskler (20 EU/ml) çimlenmiş sporların üzerine yerleştirilerek petriler 5 güne kadar bekletildi ve hifsel gelişim incelendi (Shubakov and Kucheryavykh 2004).

3.9.2. Kitinaz enziminin patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*) üzerine etkisinin incelenmesi

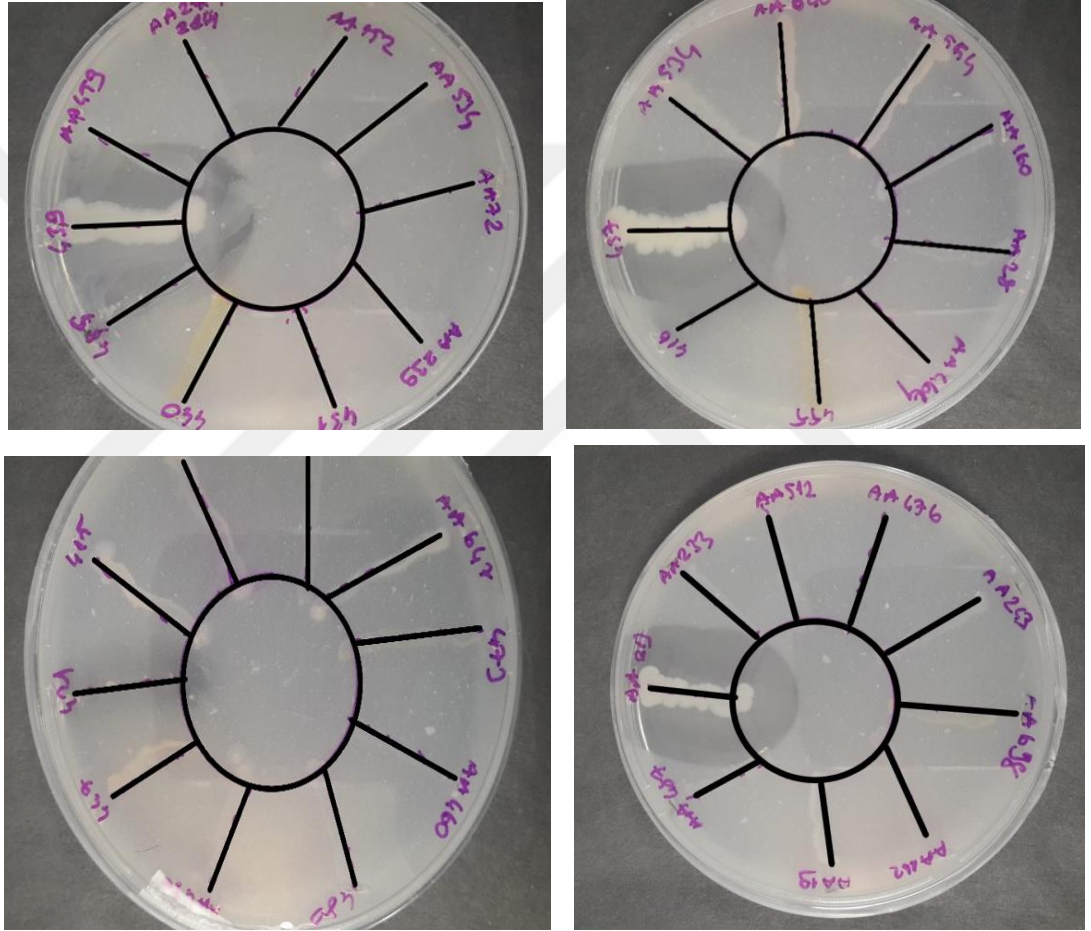
Patates tarlalarında ciddi zararlara neden olan *L. decemlineata*'ya karşı enzimin etkisini tespit etmek amacıyla ilk olarak böcekler 1 gece etil alkolde bekletildi ve steril distile su ile yıkanarak alkol uzaklaştırıldı. Cam deney tüpüne alınan böceklerin üzerine 5 ml enzim preparasyonu (20 EU/ml) eklendi ve 30°C'de 5 gün inkübe edildi. Bu süre sonunda böceklerdeki morfolojik değişimler ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülendi (Thamthiankul et al. 2001).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Katı Besi Ortamında Kitinaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Kolloidal kitin ile hazırlanmış olan katı kùltùre aktarımı yapılan 200 izolattan 72 saatlik inkùbasyon sùresi sonunda AA-439, AA-437, AA-213 ve AA-421 kodlu izolatlarda zon oluşumu gözlemlendi (şekil 4.1.).



şekil 4.1. Kollodial Kitinli Katı Kùltürde Kitinaz Aktivitesinin Belirlenmesi

4.2. Sıvı Kùltürde Kitinaz Aktivitesinin Belirlenmesi

KABB sıvı besiyerine ekim yapılan izolatlardan; AA-213 izolatının spesifik aktivitesi 1,1 EU/ml, AA-421 izolatının spesifik aktivitesi 1,5 EU/ml, AA-437/ml izolatının spesifik aktivitesi 1,79 EU/ml ve AA-439 izolatının ise 3,2 EU/ml olarak tespit

edildi. En iyi zon çapına ve spesifik aktiviteye sahip olan AA-439 kodlu izolat, tez çalışması için seçilerek çalışmalar bu izolat ile devam ettirildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. AA-439 Bakteri İzolatının Kitinaz Zon Görüntüsü

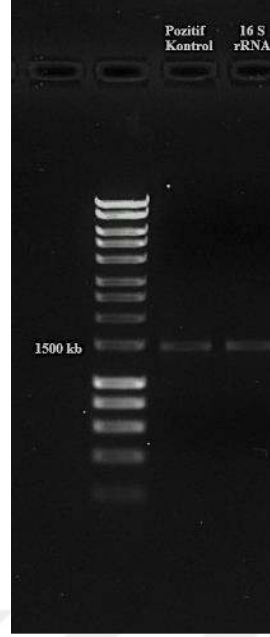
4.3. Kitinaz Aktivitesi Tespit Edilen İzolatın Morfolojik, Biyokimyasal ve Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

AA-439 bakteri izolatının morfolojik olarak çubuk şekilli, hareketli, krem renkli ve Gram negatif özellikte olduğu; biyokimyasal olarak katalaz ve proteaz pozitif, amilaz negatif olduğu, hemoliz aktivitesinin olmadığı ve fizyolojik olarak gelişebildiği sıcaklığın 25-40 °C, pH'sının 5,0-9,0 olduğu ve %2-3 tuz aralıklarında gelişebildiği tespit edildi.

4.4. Moleküler Sonuçlar

4.4.1. 16S rRNA PCR sonuçları

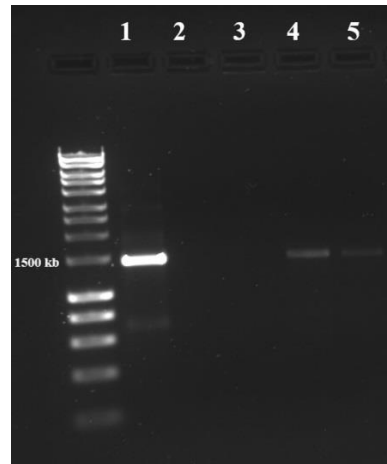
Kitinaz aktivitesi belirlenen ve genomik DNA'sı izole edilen AA-439 izolatının evrensel primerler (27F ve 1492R) kullanılarak 16S rRNA bölgesi çoğaltıldı. %1'lik agaroz jelde 90 V'da 50 dk yürütülerek jel görüntüleme sisteminde incelendiğinde yaklaşık 1500 bp uzunluğunda bant görüntülendi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. 16S rRNA PCR Jel Görüntüsü

4.4.2. 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

pGEMT-Easy vektörüne aktarılan 16S rRNA gen bölgesinin kompetent hücrelere ligasyonu ve transformasyonu yapıldı. Ardından Amfisilin + X-gal + IPTG içeren LB agar besiyeri ortamına yayma ekimi yapılarak mavi beyaz koloni oluşumu gözlemlendi. Oluşan beyaz kolonilerden rastgele 5 adet seçilerek doğruluğundan emin olmak amacıyla koloni PCR yapıldı ve gen bölgesinin bulunduğu koloniler tespit edildi (Şekil 4.4.). Gen bölgesi tespit edilen koloniler ampisilinli sıvı LB besiyerinde 16 saat inkübe edildi ve ardından plazmit izolasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 4.4. Koloni PCR Jel Görüntüsü

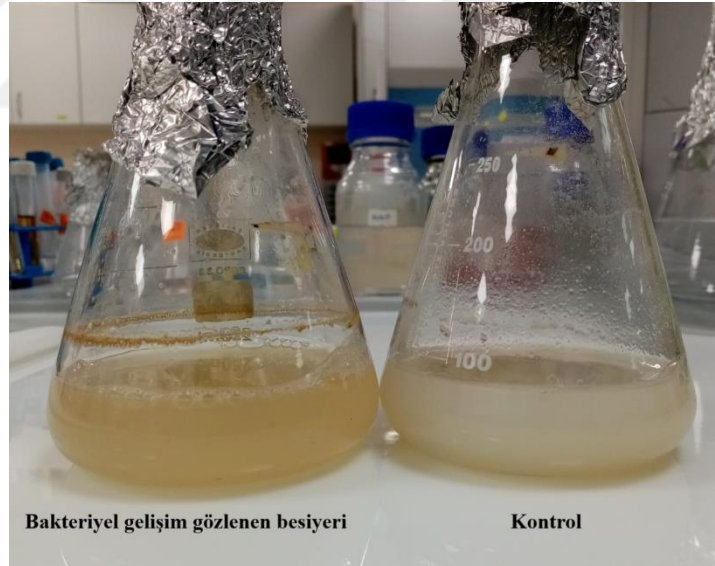
4.4.3. 16S rRNA sekans analizi

AA-439 izolatının 16S rRNA gen bölgesine ait sekans dizisi (1443 bp), GenBank'taki diğer bakterilerin 16S rRNA sekans dizileri ile karşılaştırıldı. AA-439 izolatının, *Stenotrophomonas maltophilia*'e %99 benzerliği belirlenerek tür seviyesinde tanısı yapıldı (GenBank No: MW600524).

4.5. Kitinaz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması

4.5.1. Kitinaz enziminin üretimi

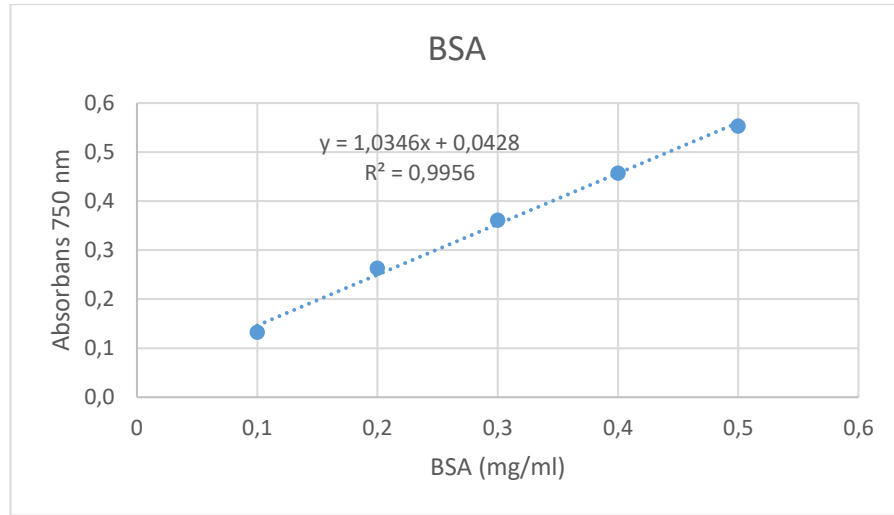
KABB sıvı besiyerine aktarılan *S. maltophilia* izolatının 30°C'de 180 rpm'de 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda kitinaz aktivite tayini yapıldı ve enzimin maksimum aktivitesini 72. saatte gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.5.).



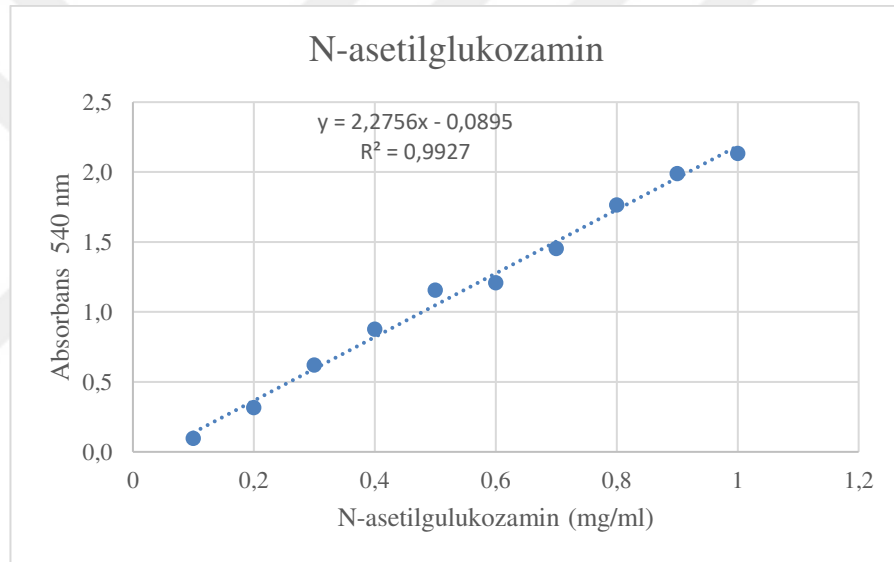
Şekil 4.5. Kollodial Kitinli Sıvı Besiyerinde Bakteriyel Gelişim

4.5.2. Protein tayini ve enzim aktivitesi için hazırlanan standart grafikler

Protein tayini için BSA standart grafiği hazırlanırken (Şekil 4.6.), kitinaz enzim aktivitesi için de N-asetilglukozamin standart grafiği hazırlandı (Şekil 4.7.).



Şekil 4.6. BSA Standart Grafiği



Şekil 4.7. N-asetilglukozamin Standart Grafiği

Enzim spesifik aktivitesi hesaplanırken standart olarak BSA ve N-asetilglukozamin grafiklerinden yararlanılarak spesifik enzim aktivitesi hesaplandı.

4.5.3. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

S. maltophilia KABB besiyerinde 30°C’de 72 saat inkübe edildi ve inkübasyon süresi sonunda kültür, 5000 rpm’de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen homojenattan amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak amonyum sülfat aralığı %20-30 olarak belirlendi. Amonyum sülfatla çöktürme işleminden sonra çöken proteinler pH 7,0 olan 50 mM Tris-

HCl tamponunda çözülüp diyaliz torbasına alındı ve 12 saat boyunca 4 °C’de bekletildi. Çalışmamızda %30’un üzerinde yaptığımız amonyum sülfat çöktürmelerinde enzim aktivitesinde düşüş olduğu gözlemlendiğinden en iyi aktivite gösteren %30’luk amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırma basamakları devam ettirildi.

4.5.4. İyon değişim kromatografisi

Diyalizden sonra santrifüj kullanılarak konsantre hale getirilen proteinler 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile dengelenmiş HiPrep Q XL 16/10 kolonuna yüklendi. Fraksiyonlar 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) içinde hazırlanmış lineer NaCl gradient (0-1 M) solüsyonu kullanılarak kolondan geçirildi ve fraksiyonlara aktivite tayini yapıldı. Aktivitenin gözlemlendiği 5 fraksiyon tüpü tespit edildi ve ilk kolonda aktivite bulunan tüpler bir araya getirilerek HiPrep™ 26/10 Desalting kolonuna (50 mM fosfat tamponu pH 7,0 dengelenmiş) yüklendi. 0-1.3 M (NH₄)₂SO₄ gradient solüsyonu ile kolondan geçirildi. İkinci kolondan toplanan her tüpe yeniden aktivite tayini yapılarak enzim aktivitesinin olduğu 6 fraksiyon tüpü tespit edildi. Fraksiyon tüplerine ve ham ekstrakta protein miktar tayini yapıldı. İyon değişimi kromatografisi sonucunda elde edilen enzimin saflaştırma tablosu yapılarak sonuçlar değerlendirildi (Çizelge 4.1.). Kitinaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ile %40,7 verimle 1,4 kat saflaştırılmışken, HiPrep Q XL 16/10 kolonu ile yapılan saflaştırmada %25,34 verimle 8,75 kat, HiPrep™ 26/10 Desalting kolonu ile de %18,12 verimle 21,52 kat saflaştırma yapıldı. Yapılan saflaştırma işleminde enzimin saflaştırma katsayısı arttıkça % verimin düştüğü ancak spesifik aktivitenin arttığı gözlemlendi.

Çizelge 4.1. *S. maltophilia*’dan İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırılan Kitinaz Enziminin Saflaştırma Tablosu

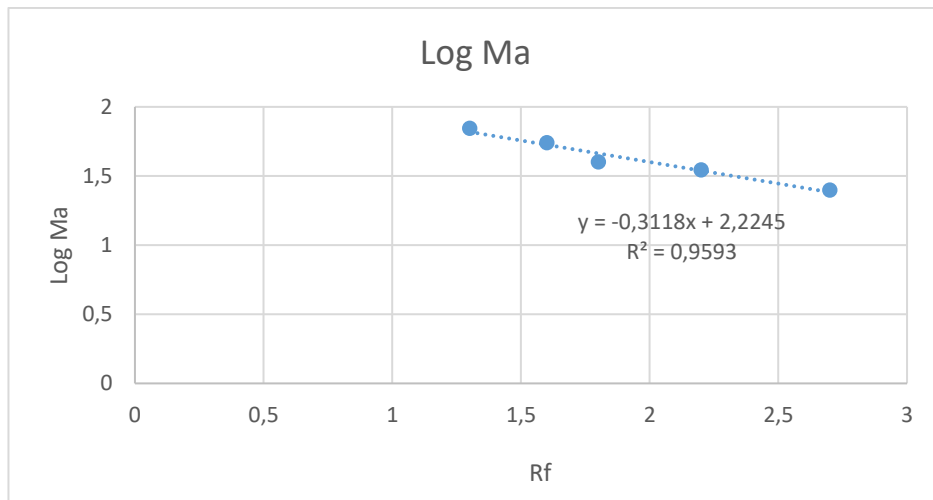
Basamak	Total Hacim (ml)	Total Aktivite (EU)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham ekstrakt	100 ml	5,13	189	0,27	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi	10 ml	2,09	5,38	0,38	40,7	1,4
HiPrep Q XL 16/10 kolonu	10 ml	1,30	0,55	2,36	25,34	8,75
HiPrep™ 26/10 Desalting kolonu	10ml	0,93	0,16	5,81	18,12	21,52

Literatürde farklı yöntemler kullanılarak yapılan saflaştırma çalışmalarında değişen oranlarda % verim ve saflaştırma katsayısına sahip sonuçlar bildirilmiştir. Örneğin, *S. maltophilia* N4'den elde edilen kitinaz enziminin aseton çöktürmesi ve jel filtrasyon yöntemi ile 8,5 kat saflaştırıldığı (Jankiewicz et al. 2015), *Bacillus pumilus* JUBCH08 izolatından elde edilen kitinaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kolonu kullanılarak %74,7 verimle 25 kat saflaştırıldığı (Bhattacharyab et al. 2016), *Bacillus* spp. BG-11'den %50-80 amonyum sülfat çöktürmesi ve jel kromatografisi (Sephadex G-100 kolonu kullanılarak) yapılarak kitinaz enziminin %15 verimle 16 kat saflaştırıldığı (Bhushan and Hoondal 1998), topraktan izole edilen *Streptomyces* spp. izolatından ise kitinaz enziminin %70 amonyum sülfat çöktürmesi ile %58,3 verimle 1,08 kat saflaştırıldığı bildirilmiştir (Sowmya et al. 2012).

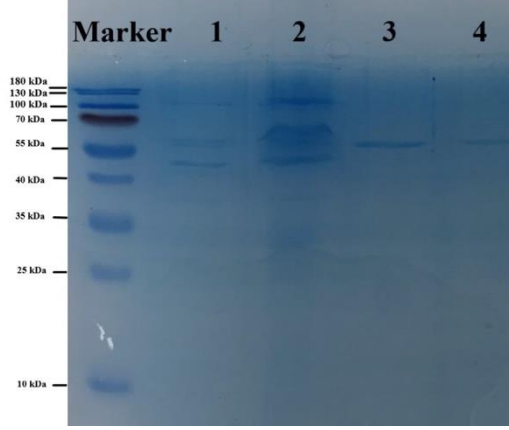
4.6. *S. maltophilia*'dan Saflaştırılan Kitinaz Enziminin Karakterizasyonu

4.6.1. Kitinaz enziminin saflık kontrolü ve molekül ağırlığının belirlenmesi

S. maltophilia'dan saflaştırılan kitinaz enziminin SDS-PAGE yöntemiyle saflığı kontrol edildi ve enzimin jelde aldığı R_f değeri hesaplandı. SDS-PAGE analizi sonucu Log MA- R_f değerleri ile çizilen grafik kullanılarak kitinaz enziminin molekül ağırlığı 52 kDa olarak hesaplandı (Şekil 4.8., Şekil 4.9.).



Şekil 4.8. SDS-PAGE Sonucuyla Oluşturulan Log Ma- R_f Grafiği

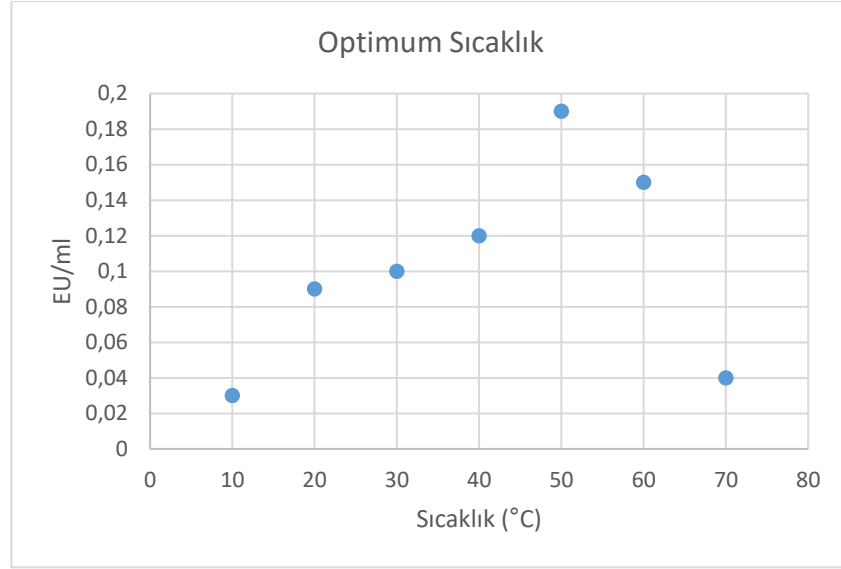


Şekil 4.9. Saflaştırılan Kitinaz Enziminin SDS-PAGE Görüntüsü
(Marker (ThermoFisher) **1:** amonyum sülfat çöktürmesi **2:** kültür süpernatantı **3:** HiPrep Q XL 16/10 kolon ürünü **4:** HiPrep™ 26/10 Desalting kolon ürünü)

Literatürde yapılan pek çok çalışmada farklı kaynaklardan izole edilen kitinazların molekül ağırlığının 26-200 kDa aralığında farklı büyüklüklerde olduğu bildirilmiştir (Chanpen et al. 1999; Lee et al. 2006; Kim et al. 2007). *S. maltophilia* kitinazı ile ilgili yapılan çalışmalarda; *S. maltophilia* MUJ'dan saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 52 kDa (Jankiewicz et al. 2012), *S. maltophilia* N4'den saflaştırılan kitinaz enziminin molekül ağırlığı 50 kDa (Jankiewicz et al. 2015) ve *S. rhizophila* G22'den saflaştırılan kitinaz enziminin molekül ağırlığının da 50 kDa (Jankiewicz et al. 2020) olarak bulunmuştur. Bu çalışma kapsamında enzimin molekül ağırlığının literatür ile uyum içinde olduğu tespit edilmiştir.

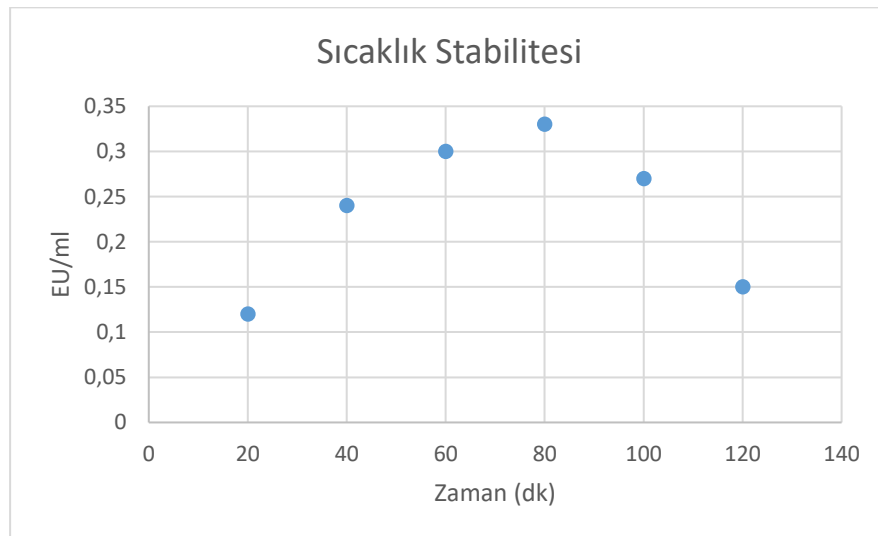
4.6.2. Kitinaz enziminin optimum sıcaklığının ve sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan kitinaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'de enzim aktivitesine bakıldı ve enzimin optimum sıcaklığının 50°C olduğu tespit edildi (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Saflaştırılan Kitinaz Enziminin Optimum Sıcaklığı

Enzimin optimum sıcaklığı olan 50 °C de farklı sürelerde (20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dk) inkübasyona bırakılarak enzim aktivitesi ölçüldü. Saflaştırılan enzimin 50 °C’de aktivitesini 100 dk boyunca koruduğu, 100 dk sonunda ise enzim aktivitesinde düşüş olduğu tespit edildi (Şekil 4.11.). Enzimin optimum sıcaklıkta uzun süre bekletildiğinde aktivitesinin azalması beklenirken çalışmamızda 80 dk’ya kadar enzim aktivitesinin arttığı gözlemlendi. Bu durumun buharlaşmaya dayalı olarak enzim konsantrasyonunun artması sonucu olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla enzim üzerine buharlaşmayıcı önleyici bir maddenin eklenerek hacimsel olarak kaybı engellenebilir.

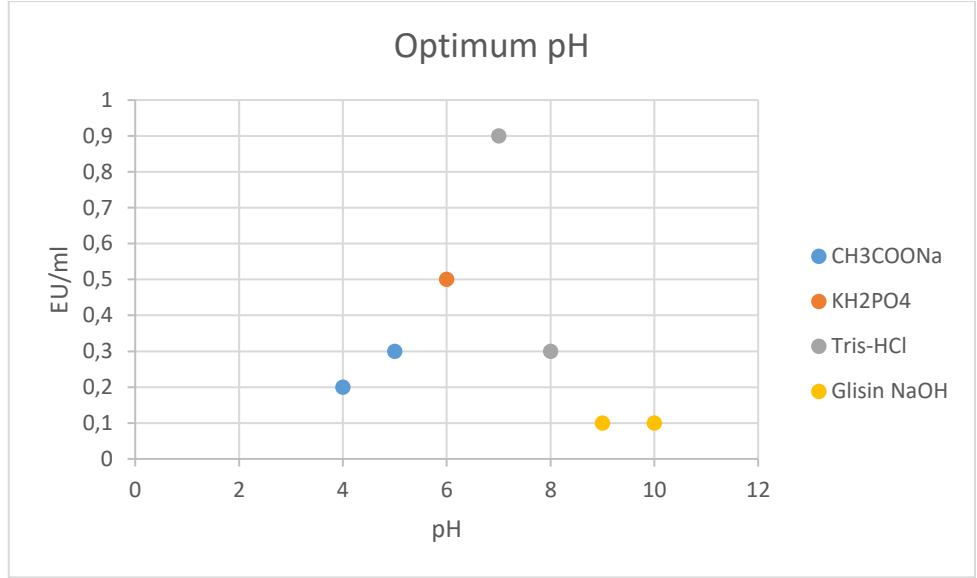


Şekil 4.11. Kitinaz Enziminin Kararlılığı Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Kitinaz enzimi üzerine sıcaklık etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda enzimin optimum sıcaklığının genel olarak 50-65 °C olduğu bildirilmiştir (Frankowski et al. 2001; Zhang et al. 2001; Sandallı et al. 2008). Farklı bakteri izolatları ile yapılan bazı çalışmalarda örneğin *S. maltophilia* C3'den elde edilen kitinaz enziminin optimum sıcaklığının 40-50 °C (Zhang et al. 2001), *Serratia plymuthica* HRO-C48'den saflaştırılan kitinaz enziminin optimum sıcaklığının 50-60 °C (Frankowski et al. 2001), *Paenibacillus barengoltz* izolatından rekombinant olarak üretilen kitinaz enziminin optimum sıcaklığının ise 55 °C olduğu (Yang et al. 2016) bildirilmiştir. Bu bağlamda çalışmamızda saflaştırılan kitinaz enziminin optimum sıcaklığının literatür ile benzer olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında enzimin sıcaklık stabilitesi ile yapılan bazı çalışmalar da ise enzimin 65 °C'de 1,5 saate kadar %60'ın üzerinde stabil kalabileceği bildirilmiştir (Sandallı et al. 2008). Çalışmamızda ise enziminin optimum sıcaklığının literatür ile benzer olduğu belirlenmiştir.

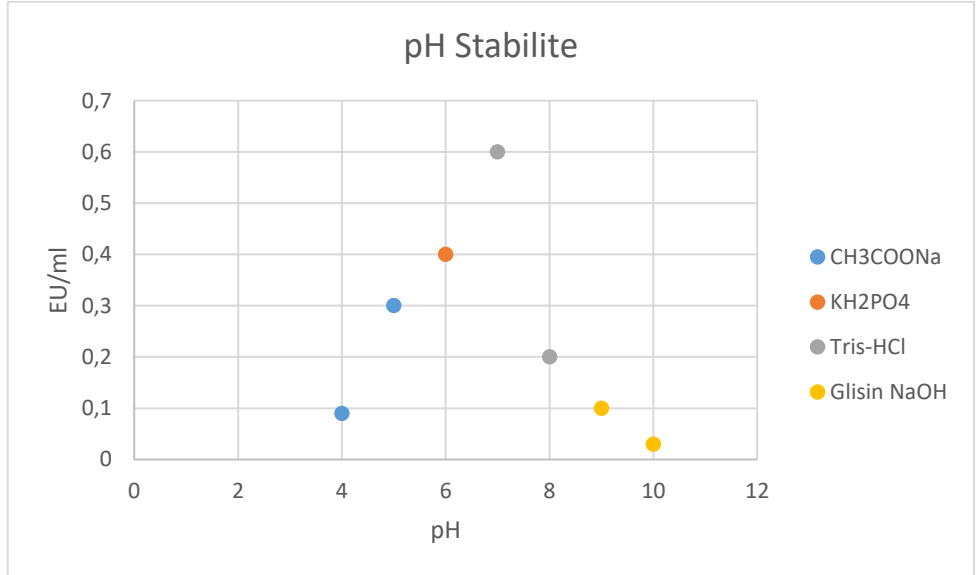
4.6.3. Kitinaz enziminin optimum pH'sının ve pH stabilitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan kitinaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için pH 4,0-10,0 değerlerinde enzim aktiviteleri incelendi ve enzimin optimum pH'sının 7,0 olduğu belirlendi. Saflaştırılan enzimin optimum pH'sının belirlenmesi amacıyla enzim örnekleri pH 4,0-10 aralığında farklı tamponlarla muamele edildi ve enzim ünite değerleri hesaplandı. Saflaştırılan enzimin aktivitesinde pH 8,0' den sonra hızlı bir düşüş gözlemlendi. Bu durum enzimin yüksek alkali pH'larda aktif olmadığını gösterdi (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Kitinaz Enziminin Optimum pH Grafiği

pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla, enzim örnekleri 50 mM, pH 4,0-10,0 aralığındaki farklı tamponlarla 1:1 oranında 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve enzim ünite değerleri hesaplandı. Sonuçta pH 7,0'de enzimin aktivitesini büyük ölçüde koruduğu, pH 4,0-10 aralığında ise aktivitesini %2'ye kadar koruduğu tespit edildi (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Kitinaz Enziminin Kararlılığı Üzerine pH'nın Etkisi

Literatürde yapılan çalışmalarda; *S. maltophilia*'dan rekombinant olarak üretilen kitinaz enziminin optimum pH'sının 5,0 olduğu (Suma ve Podile 2013), *S. rhizophila*

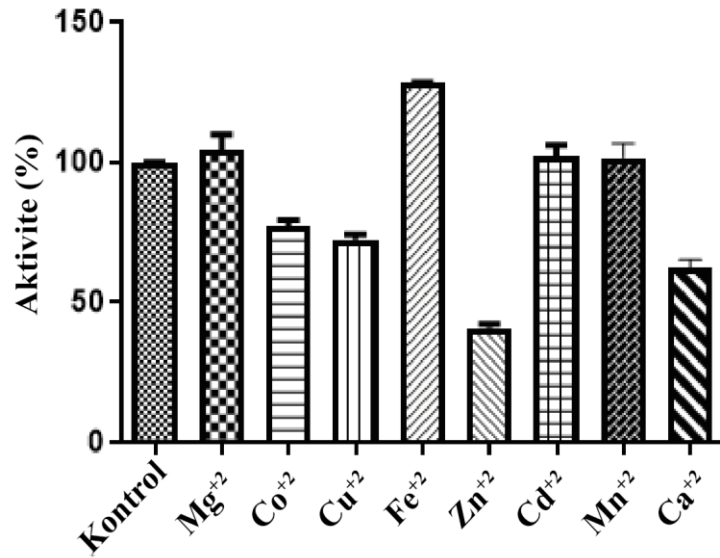
G22'den izole edilen kitinaz enziminin optimum pH'sının 5,9 olduğu (Jankiewicz et al. 2020), *S. maltophilia* C3'den elde edilen kitinaz enziminin optimum pH'sının 4,5-5,0 aralığında olduğu bildirilmiştir (Zhang et al. 2001). Literatürde belirtildiği üzere *Stenotrophomonas* izolatlarının genel olarak asidik pH'da optimum aktivite gösterdiği ancak bu tez kapsamında ise enzimin optimum pH'sının asidik değil nötral olduğu tespit edildi. Nötral kitinazlar genellikle medikal amaçlar için kito oligosakkarit üretim süreçlerinde kullanılmaktadır (Yuli et al. 2004). Bu doğrultuda enzimin farklı kullanım alanlarına sahip olabileceğini söylemek mümkündür. Bunun yanında *Bacillus* spp. DAU101 izolatına ait kitinazın optimum pH'sının 7.5 (nötral) olduğu (Lee et al. 2007), *Bacillus* spp. NCTU2'den izole edilen kitinaz enziminin optimum pH değerinin 7 olduğu ve enzimin kararlılığını 60 °C sıcaklıkta 6,0-8,0 pH'da sürdürdüğü (Wen et al. 2002) bildirilmiştir. Bu doğrultuda bizim izole ettiğimiz pH değerinin de *Bacillus* cinslerinden izole edilen enzime benzer pH'da aktivite gösterdiği söylenilebilir. Ancak literatürde *Bacillus* türüne yakın olarak bilinen *Paenicibacillus barengoltzi* izolatından rekombinant olarak üretilen kitinaz enziminin optimum pH'sının 5,5 olduğu dolayısıyla bakteri türüne göre enzimin pH stabilitesinin de farklılık gösterdiğini söylemek mümkündür.

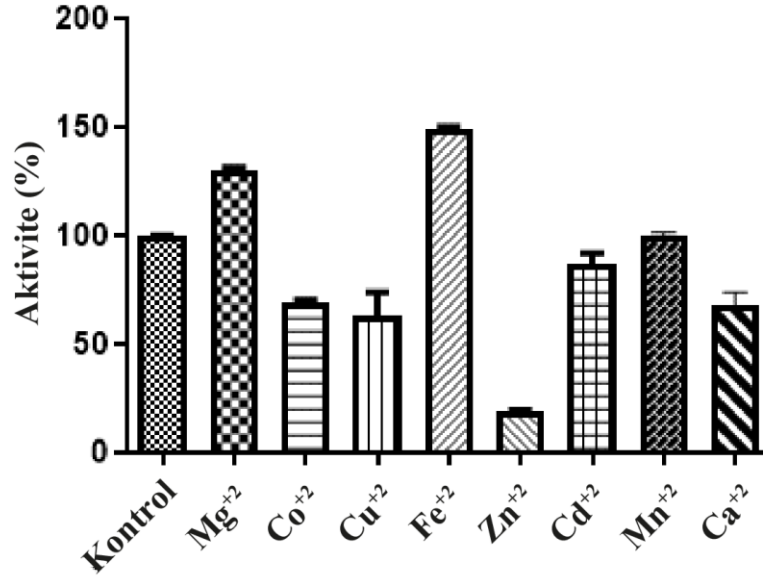
4.6.4. Kitinaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisinin belirlenmesi

Metal iyonlarından Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi ve kontrole göre kalan aktivite hesaplandı. Buna göre, 1 mM Fe^{2+} , Cd^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının kitinaz enzimini aktive ettiği, Mg^{2+} iyonunun enzim aktivitesini koruduğu, Zn^{2+} iyonunun ise enzim aktivitesini %60 oranına kadar düşürdüğü belirlendi (Çizelge 4.2., Şekil 4.14.). İyon molaritesi 5 mM olduğunda Mg^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının enzimi aktive ettiği tespit edildi (Şekil 4.15.). 1mM Cd^{2+} kitinaz enziminin az da olsa enzimin aktivesini artırdığı, 5 mM Cd^{2+} iyonunun enzim aktivitesini düşürdüğü, en yüksek oranda inhibisyonun ise Zn^{2+} iyonlarıyla muamelede gerçekleştirdiği kaydedildi.

Çizelge 4.2. Kitinaz Enzimi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

Metal iyonları	1 mM	5 mM
Kontrol	100±0,00	100±0,00
Mg ²⁺	94,03± 0,4555	130,1± 0,0001
Co ²⁺	77,03± 0,0004	68,68 ± 0,0001
Cu ²⁺	72,33± 0,0001	63,10± 0,0277
Fe ²⁺	128,00± 0,0001	149,5± 0,0001
Zn ²⁺	40,65± 0,0001	19,29± 0,0001
Cd ²⁺	101,9± 0,6038	86,85± 0,0608
Mn ²⁺	101,5± 0,7232	100,0± 0,7595

**Şekil 4.14.** Kitinaz Enzimi Üzerine 1 mM Metal İyonlarının Etkisi



Şekil 4.15. Kitinaz Enzimi Üzerine 5 mM Metal İyonlarının Etkisi

Literatüre bakıldığında metal iyonlarının kitinazlar üzerine etkisinin oldukça farklı olduğu görülmektedir (Yuli et al. 2004). *S. maltophilia* C3' den elde edilen kitinaz enziminin 1 ve 5 mM'lık Fe³⁺ metal iyonları tarafından inhibe edildiği (Zhang et al. 2001) bildirilmişken bu tez kapsamında Fe³⁺ iyonlarının her iki konsantrasyonda da enzim aktivitesini artırdığı gözlenmiştir. Yine *Bacillus* sp. DAU101'den saflaştırılan kitinaz enziminin 1,5 ve 10 mM'lık Zn²⁺, Cu²⁺ ve Hg²⁺ tarafından inhibe edildiği (Lee et al. 2006), *S. plymuthica* HRO-C48'den saflaştırılan kitinaz enziminin 10 mM'lık Co²⁺ ve Cu²⁺ tarafından ciddi oranda inhibe edildiği (Frankowski et al. 2001), *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130'den saflaştırılan kitinaz enziminin ise Hg²⁺, Cd²⁺ ve Ni²⁺ tarafından tamamen inhibe edildiği bildirilmiştir (Taechowisan et al. 2003). Bu bağlamda bu tez kapsamında da benzer sonuçlar bulunduğunu söylemek mümkündür.

4.6.5. Kitinaz enzimi üzerine çeşitli reaktiflerin etkisinin belirlenmesi

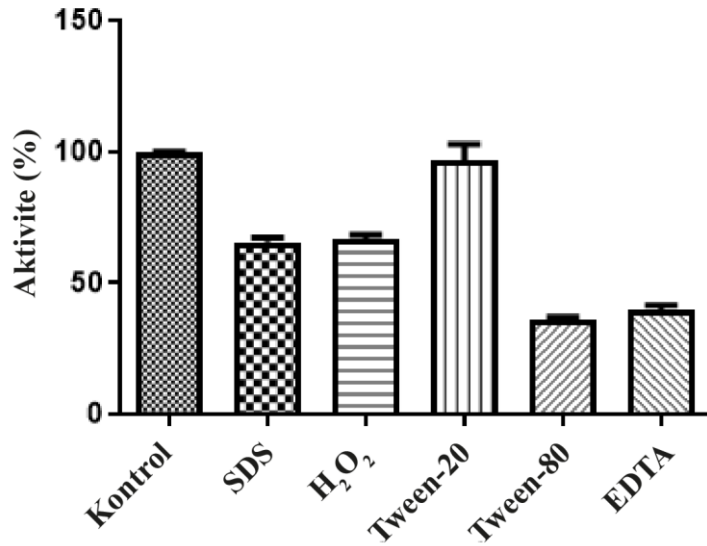
Enzim aktivitesi üzerine çeşitli reaktiflerin etkisini incelemek amacıyla enzim üzerine, %1 ve %5 oranlarında EDTA, H₂O₂, SDS, Tween 20 ve Tween 80 çözeltileri uygulandı ve kontrole göre aktiviteleri hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda, tüm reaktiflerin molaritesi arttırılınca enzim inhibisyonunun da arttığı gözlemlendi. Elde edilen sonuca göre en yüksek inhibisyonun EDTA'da olduğu belirlendi (Çizelge 4.3., Şekil 4.16., Şekil 4.17.). Metal şelatlama inhibitörü olarak da bilinen EDTA ile enzimin

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

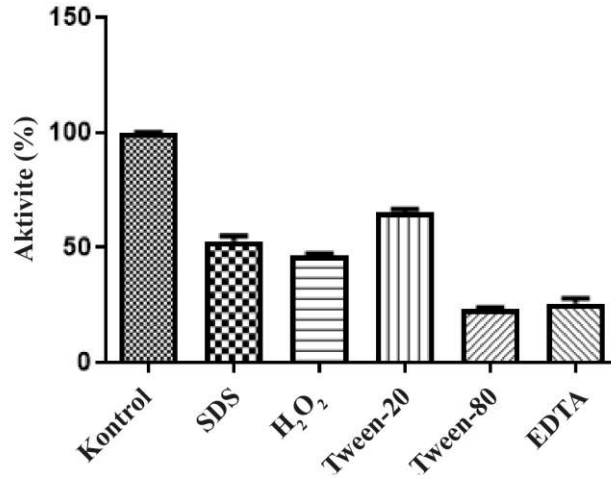
inhibe olması söz konusu enzimin metalo enzim olduğunun bir göstergesi olarak kabul edildi (Jankiewicz et al. 2014).

Çizelge 4.3. Kitinaz Enzimi Üzerine Reaktiflerin Etkisi

Reaktifler	%1	%5
Kontrol	100±0.00	100±0.00
SDS	65,61 ± 0,0001	52,64±0,0001
H₂O₂	66,75 ± 0,0001	46,33± 0,0001
Tween 20	96,47± 0,6470	65,15± 0,0001
Tween 80	35,90±0,0001	23,33± 0,0001
EDTA	39,66±0,0001	25,36±0,0001



Şekil 4.16. Kitinaz Enzimi Üzerine %1 Oranında Kullanılan Reaktiflerin Etkisi



Şekil 4.17. Kitinaz Enzimi Üzerine %5 Konsantrasyondaki Reaktiflerin Etkisi

Literatürde yapılan çalışmalarda reaktiflerin genel olarak kitinaz enzim aktivitesini inhibe ettiği (Annamalai et al. 2010; Farag et al. 2016), bazı çalışmalarda ise enzimin bu reaktiflere karşı dirençli olabileceği (Toharisman et al. 2005) veya az da olsa EDTA, Tween 20 ve Tween 80 gibi reaktiflerin aktivite de artışa neden olabileceği bildirilmiştir (Jankiewicz et al. 2015).

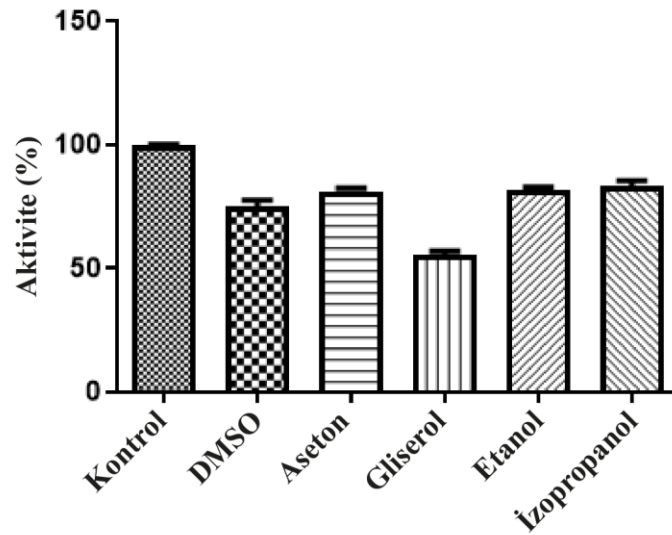
4.6.6. Kitinaz enzimi üzerine çeşitli çözücülerin etkisinin belirlenmesi

Organik çözücülerin saflaştırılan kitinaz aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla DMSO, aseton, gliserol, etanol ve izopropanol çözücüler (%5, %15, v/v) kitinaz enzimi ile 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kitinaz aktiviteleri ölçülerek, kontrol numunesine göre % aktiviteleri hesaplandı (Çizelge 4.4.). Hesaplamalar sonucunda, her iki konsantrasyonda da tüm çözücülerin enzim aktivitesini düşürdüğü tespit edildi (Şekil 4.18., Şekil 4.19.). %5 konsantrasyon değerinde en yüksek inhibisyonun gliserolde (%45 oranında), %15’de ise aseton (%54 oranıyla) çözücüsünde olduğu belirlendi. Aynı zamanda gliserol konsantrasyonu arttıkça inhibisyon oranının yaklaşık olarak aynı değerde kaldığı, diğer çözücülerde ise inhibisyon oranının arttığı tespit edildi.

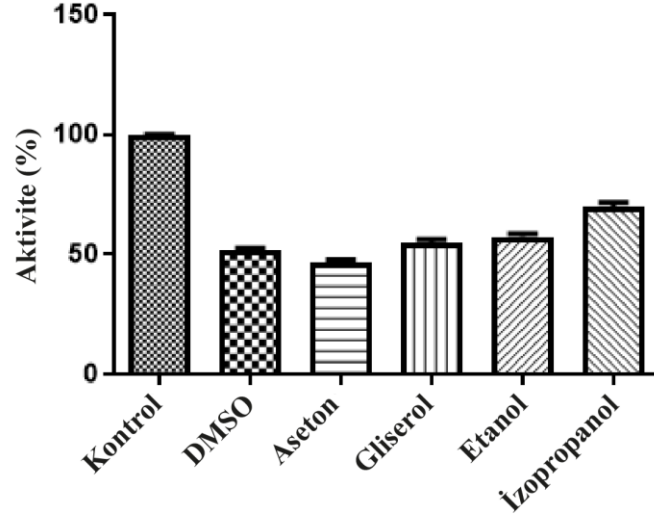
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.4. Kitinaz Enzimi Üzerine Çözücülerin Etkisi

Çözücüler	%5	%15
Kontrol	100±0.00	100±0.00
DMSO	74,86±0,0007	51,61 ± 0,0001
Aseton	81,28± 0,0001	46,31 ± 0,0001
Gliserol	55,56± 0,0001	54,54± 0,0001
Etanol	81,42± 0,0002	57,19±0,0001
İzopropanol	83,22±0,0016	69,75±0,0001



Şekil 4.18. Kitinaz Enzimi Üzerine %5 Konsantrasyondaki Çözücülerin Etkisi



Şekil 4.19. Kitinaz Enzimi Üzerine %15 Çözücülerin Etkisi

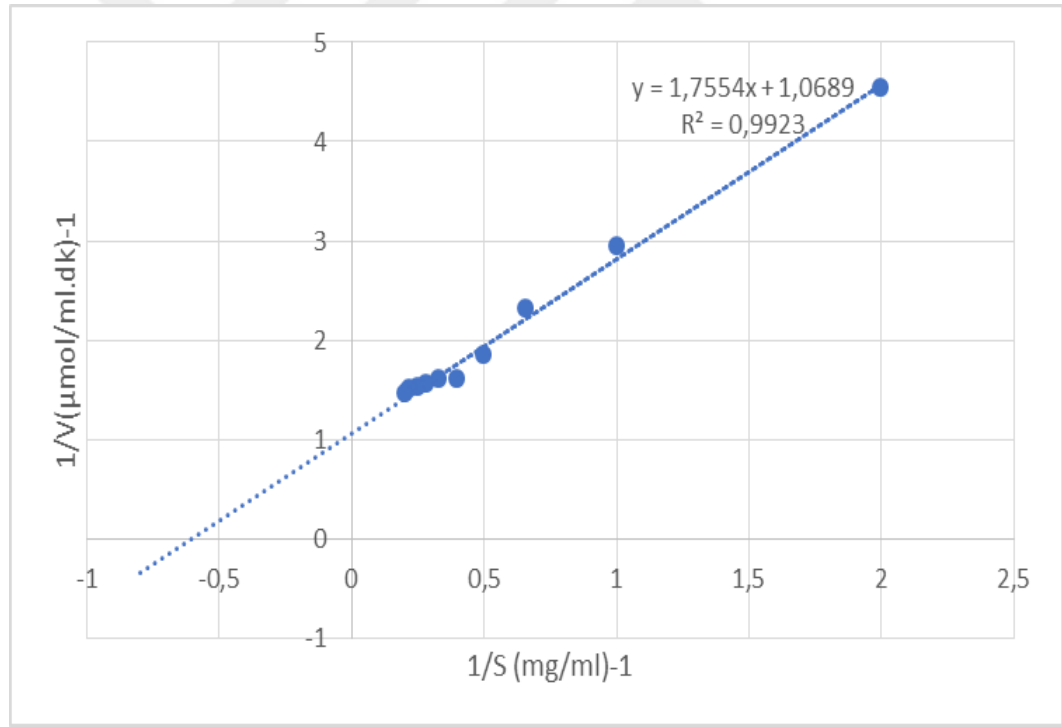
Litaratürde yapılan çalışmalarda farklı izolatlarda saflaştırılan kitinaz enziminin etanol, izopropanol, DMSO ve aseton ile muamelesi sonucunda bu çözücülerin enzim aktivitesini düşürdükleri tespit edilmiştir (Karthik et al. 2015, Cheba et al. 2016). Bu tez kapsamında bulunan sonuçlar da litaratür ile uyumludur.

4.6.7. Kitinaz enzim reaksiyonuna ait K_m ve V_{max} kinetik sabitlerinin belirlenmesi

Saflaştırılan kitinaz enziminin kolloidal kitine olan ilgisinin araştırılması sonucunda elde edilen verilerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,6 mg/ml, 1,07 $\mu\text{mol. ml}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ olarak hesaplandı (Çizelge 4.5., Şekil 4.20.).

Çizelge 4.5. Kitinaz Enziminin Substrat Konsantrasyonu-Aktivite Grafiği

Substrat konsantrasyonu (mg/ml)	Aktivite (EU/ ml.dk)	1/S	1/V
1	0,34	1	2,94
1,5	0,43	0,66	2,32
2	0,54	0,5	1,85
2,5	0,62	0,4	1,61
3	0,62	0,33	1,61
3,5	0,64	0,28	1,56
4	0,65	0,25	1,53
4,5	0,66	0,22	1,51
5	0,68	0,2	1,47

**Şekil 4.20.** Kitinaz Enziminin Lineweaver-Burk Grafiği

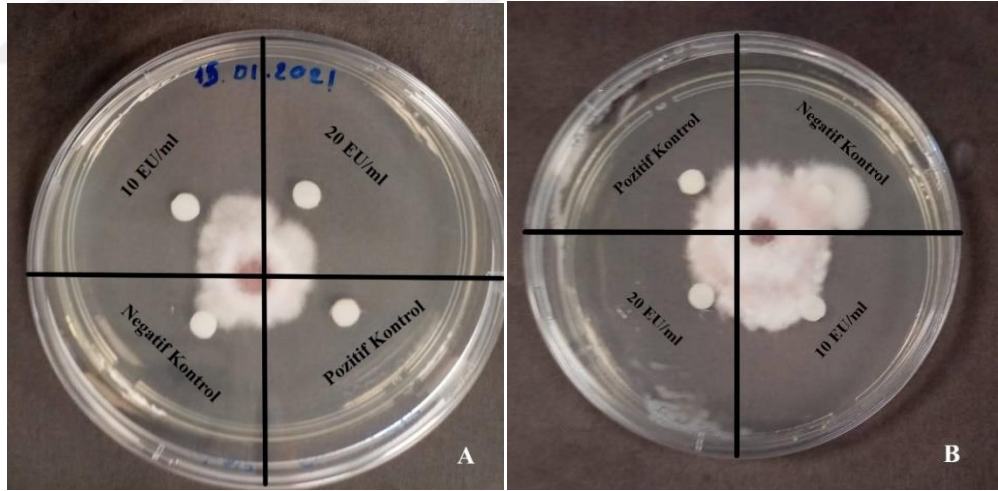
Literatürde birçok çalışmada kitinaz enziminin substrata olan ilgisinin genellikle düşük olduğu hesaplanan K_m değerleri ile bildirilmiştir (Gangwar et al. 2016). *S. rhizophila* G22'den saflaştırılan kitinaz enzimi 4-Nitrophenyl β -d-N, N', N''-triacylchitotriose substratı kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,87 mM ve 89,7

$\mu\text{M/h}$ olduğu (Jankiewicz et al. 2020), *Streptomyces violascens* NRRL B2700'den izole edilen kitinaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,556 mg/ml ve 2,680 $\mu\text{M/dk/mg}$ (Gangwar et al. 2016), *Streptomyces chilikensis* RC1830'den izole edilen kitinaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri de sırasıyla 0,02 mM ve 3,184 mol/dk/mg olduğu bildirilmiştir (Ray et al. 2019).

4.7. Kitinaz Enziminin Biyoteknolojik Uygulamaları

4.7.1. Kitinaz enziminin antifungal aktivitesinin belirlenmesi

Saflaştırılan kitinaz enziminin antifungal aktivitesinin tespiti amacıyla, 20 μl (10 ve 20 enzim ünitesi) enzim emdirilen diskler, *F.oxysporum*'un 1,5 cm uzağına konuldu ve 5 gün boyunca fungusun büyümesi gözlemlendi. Üç günün sonunda fungusun negatif kontrole doğru gelişmeye devam ederken disklerle emdirilen enzimlere doğru gelişiminin yavaşladığı fakat 3. günden sonra etkinliğinde azalma olduğu belirlendi (Şekil 4.21.).

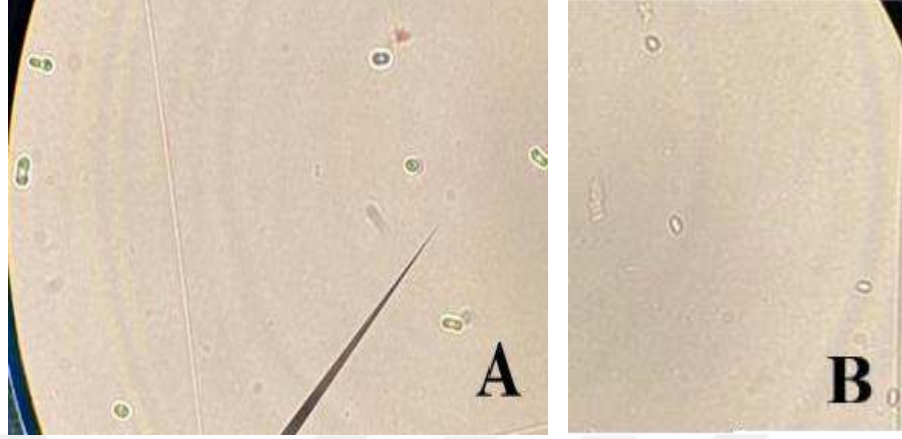


Şekil 4.21. Kitinaz Enziminin Antifungal Etkisi (A: 3 gün sonra, B: 5 gün sonra)

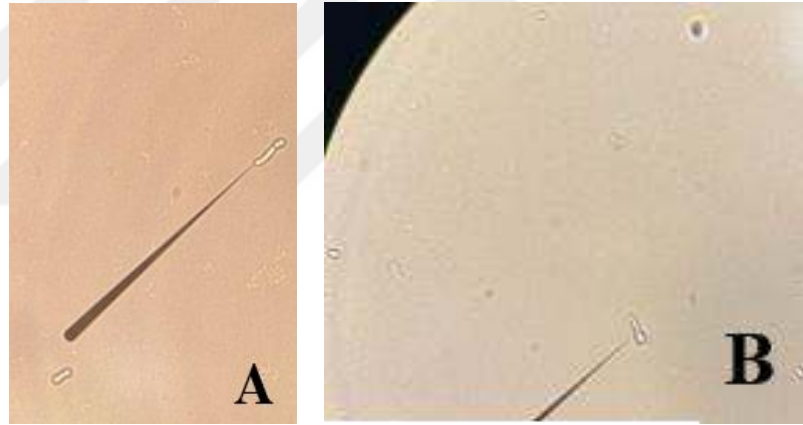
a. Enzimin spor çimlenmesi üzerine etkisi

Saflaştırılan kitinaz enziminin *F. oxysporum* sporunun çimlenmesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla öncelikle deney tüplerine 6×10^3 sayıda fungal spor konuldu. Kontrol ile kıyaslanarak 6,12 ve 24. saatlerde çimlenen ve çimlenmeyen sporlar sayıldı. Germ tüpünün boyu spor boyunun yarısına ulaştığında spor çimlenmiş kabul edildi (Paul

et al. 1993) (Şekil 4.22., Şekil 4.23.). Çizelge 4.6.'de görüldüğü üzere enzimin kontrole göre spor çimlenmesini önemli derecede engellediği tespit edildi.



Şekil 4.22. Kitinaz Enziminin 6. Saatte Spor Çimlenmesi Üzerine Etkisi
(A: Kontrol, B: Örnek)



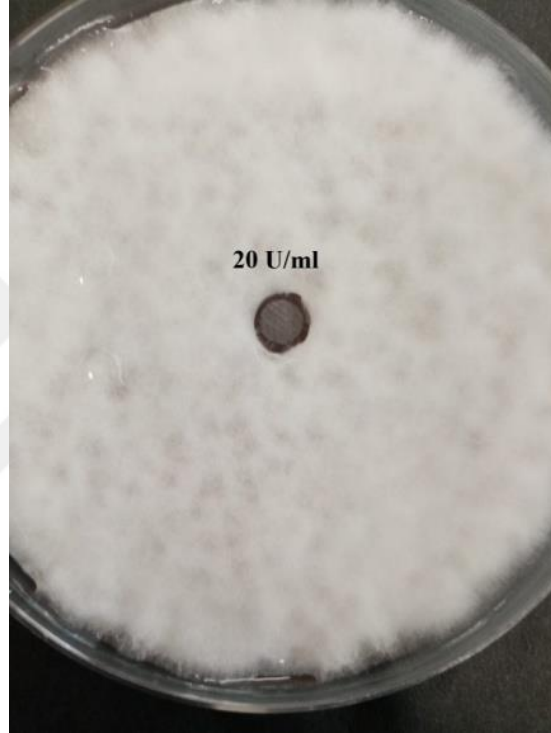
Şekil 4.23. Kitinaz Enziminin 24. Saatte Spor Çimlenmesi Üzerine Etkisi
(A: Kontrol, B: Örnek)

Çizelge 4.6. Saflaştırılan Kitinaz Enziminin Spor Çimlenmesi Üzerine Etkisi

	Kontrol		Deney Tüpü	
	Çimlenen	Çimlenmeyen	Çimlenen	Çimlenmeyen
6. saat	3×10^3	3×10^3	2×10^3	4×10^3
12. saat	5×10^3	10^3	2×10^3	4×10^3
24. saat	5×10^3	10^3	3×10^3	3×10^3

b. Enzimin hif büyümesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Enzimin hif büyümesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacı ile 10^5 spor/ml fungus spor çözeltilerinden 1 ml alınıp PDA petrileri üzerine inoküle edildi. 24 saat sonra, kitinaz içeren diskler (20 EU/ml) çimlenmiş sporların üzerine yerleştirildi ve 5 gün boyunca hif ve misel oluşumları gözlemlendi. Yapılan çalışma sonucunda saflaştırılan enzimin fungusun hifsel gelişimini az da olsa engellediği belirlendi (Şekil 4.24.).

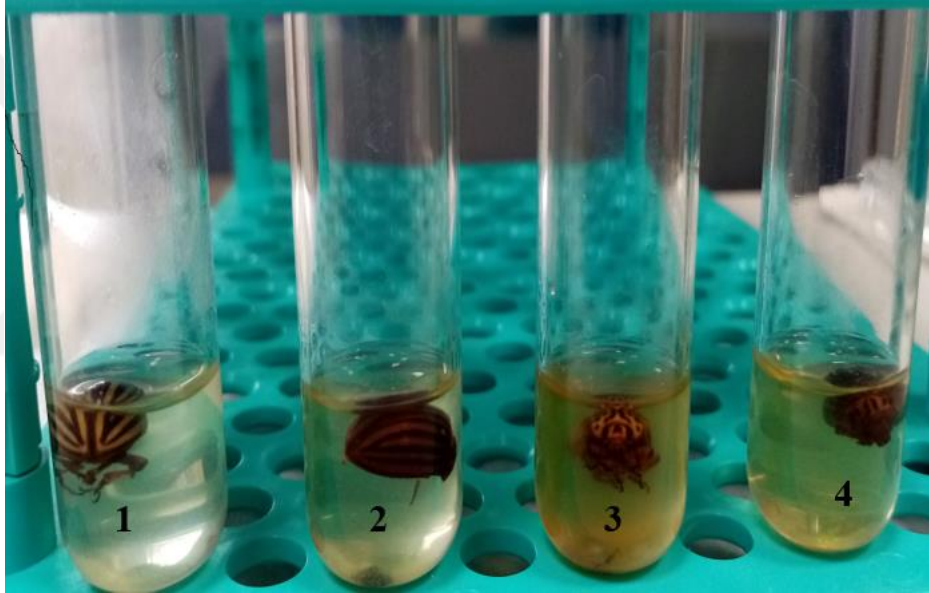


Şekil 4.24. Kitinaz Enziminin Hif Büyümesi Üzerine Etkisi

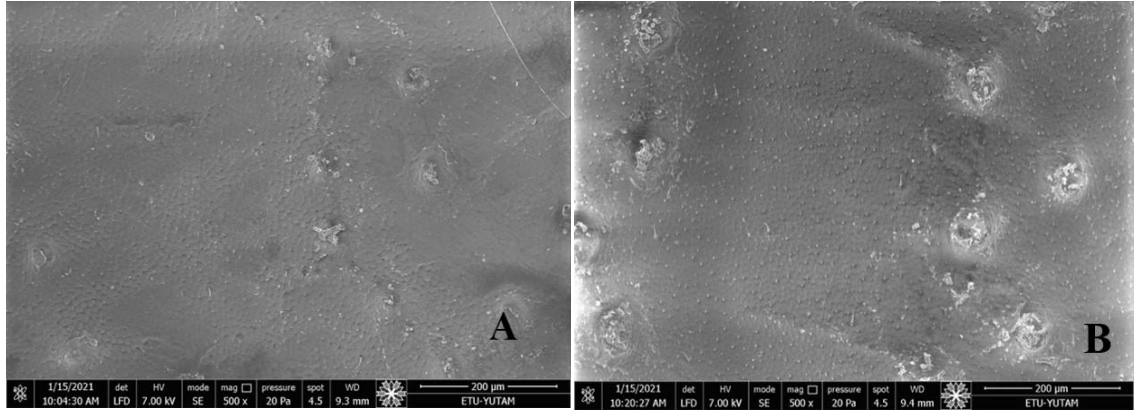
Litaratürde yapılan çalışmalarda; *S. maltophilia*'dan elde edilen StmChiA kitinaz enziminin *F. oxysporum*'a karşı güçlü antifungal etkisinin olduğu (Suma et al. 2013), *B. subtilis* TV-125A'dan elde edilen kitinaz enziminin *Fusarium culmorum*'un gelişimini olumsuz etkilediği (Senol et al. 2014), *Bacillus cereus*'dan elde edilen kitinaz enziminin *F. oxysporum* ve *R. solani*'ye karşı antifungal aktivitesinin olduğu (Pleban et al. 1997) ve *B. pumilus* SG2'den elde edilen kitinaz enzimin de *F. graminearum*'un gelişimini güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Shali et al. 2010). Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar da genel olarak literatür ile uyumludur.

4.7.2. Kitinaz enziminin patates böceği (*L. decemlineata*) üzerine etkisinin incelenmesi

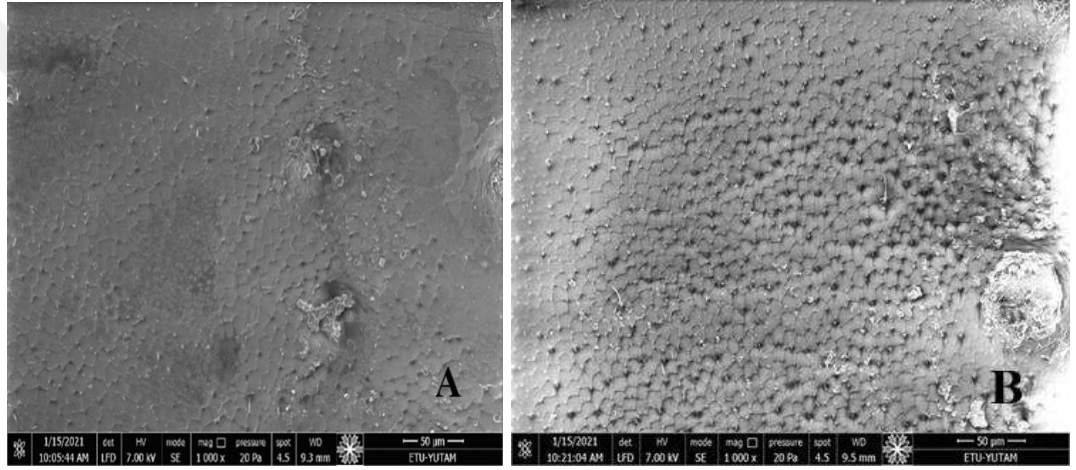
Saflaştırılan kitinaz enziminin patates böceği (*L. decemlineata*) üzerine etkisini incelemek amacıyla böcekler 5 gün boyunca enzimle muamele edildi (Şekil 4.25.). 5. günün sonunda deney tüplerinde bulunan böceklerin baş ve bacaklarında kopmalar meydana geldiği gözlemlendi. Enzimin böceğin kanat yapısının yüzeyinde meydana getirdiği değişimler SEM ile görüntülenerek kaydedildi (Şekil 4.26., Şekil 4.27.). SEM görüntüleri incelendiğinde enzimle muamele sonucunda böceğin elytrası yüzeyinde bulunan altıgen şekilli hücrelerin sıkı yapılarının bozulduğu tespit edildi.



Şekil 4.25. Kitinaz Enziminin Patates Böcekleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi
(**1:** Kontrol grubu: 5 ml dH₂O ve böcek; **2, 3, 4:** Deney grubu: 5 ml enzim (20 EU/ml) ve böcek)



Şekil 4.26. Kitinaz Enziminin Patates Böcekleri Üzerine Etkisinin 500X SEM Görüntüsü (A: Kontrol, B: Örnek)



Şekil 4.27. Kitinaz Enziminin Patates Böcekleri Üzerine Etkisinin 1000X SEM Görüntüsü (A: Kontrol, B: Örnek)

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Dünya nüfusunun hızla artması ve buna bağlı olarak artan küresel talep karşısında ucuz, üretimi kolay, doğal, çevreye zarar vermeyen ve ekolojik döngüde parçalanması kolay biyoteknolojik ürünlere olan ilgi oldukça artmıştır. Bu ürünlerin başında da hücre içi ortamda reaksiyonları katalizleyen ve dış ortamda da aynı şekilde işlev görebilen enzimler gelmektedir. Bu enzimlerden biri olan ve pek çok kullanım alanına sahip olan kitinaz, uygun bir üretici mikroorganizmanın varlığında kolaylıkla üretilerek endüstri ve tarım alanındaki uygulamalarda yerini alacak ve ülke ekonomisine katkıda bulunabilecektir. Ekstrasellüler enzimler arasında adı geçen kitinaz enzimi fungusların hücre duvarı ile böceklerin dış iskelet yapılarında bulunduğu için biyokontrol ajanı olarak hastalık (fungal patojenler) ve zararlılara karşı tarımsal alanda biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılabilir.

Bu amaçla yola çıkılan bu çalışmada;

* Kültür koleksiyonumuzda yer alan yaklaşık 200 izolatın enzim aktivitesi test edildi ve etkili olduğu belirlenen 4 izolattan aktivite testlerine göre en etkili olanı seçilerek çalışmalarda kullanıldı.

* Enzim aktivitesi yüksek olarak belirlenen izolat, klasik ve moleküler metotlarla *Stenotrophomonas maltophilia* olarak tanılandı.

* *S. maltophilia* 'dan kitinaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ile %40,7 verimle 1,4 kat saflaştırılırken, HiPrep Q XL 16/10 kolonu ile yapılan saflaştırmada % 25,34 verimle 8,75 kat, HiPrep™ 26/10 Desalting kolonu ile de %18,12 verimle 21,52 kat saflaştırıldı.

* Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu yapıldı ve enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemiyle 52 kDa olarak hesaplandı.

* Enzimin optimum sıcaklığı 50 °C ve optimum pH değeri 7,0 olarak belirlendi.

* Saflaştırılan enzimin sıcaklık ve pH stabiliteleri belirlendi. Enzimin optimum sıcaklığı olan 50 °C’de aktivitesini yaklaşık 2 saate kadar koruduğu tespit edildi. Aynı zamanda enzimin 4,0-10,0 aralığındaki pH’da aktivitesini %2’ye kadar koruduğu, en yüksek stabilitenin görüldüğü pH 7,0’de ise %66’ya kadar koruduğu belirlendi.

* Enzim aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonları (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) ve reaktiflerin (%1 ve %5 oranlarında EDTA, H_2O_2 , SDS, Tween 20 ve Tween 80) etkisi araştırıldı. 1 mM konsantrasyondaki Fe^{2+} , Cd^{2+} ve Mn^{2+} iyonları ile 5 mM konsantrasyondaki Mg^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının enzim aktivesini artırdığı, bunun dışında test edilen tüm reaktiflerin ve çözücülerin ise enzim aktivitesini düşürdüğü tespit edildi.

* Kolloidal kitin için enzimin V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla $1,07 \mu\text{mol.ml}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ ve 0,6 mg/ml olarak hesaplandı.

* Saflaştırılan enzimin biyoteknolojik olarak tarımsal hastalık ve zararlılara karşı kullanımları araştırıldı. Enzimin *Fusarium oxysporium*’un çimlenmesi ve hifsel gelişimini olumsuz etkilediği, *Leptinotarsa decemlineata* böceğinin ise kitin yapısında bozulmalara sebep olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, *S. maltophilia*’den spesifik aktivitesi oldukça yüksek olan kitinaz enzimi saflaştırılarak karakterize edilmiş ve enzimin antifungal etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda saflaştırılan enzimin özellikle pestisitlere karşı oldukça dirençli olduğu bilinen patates böceğinin kitin yapısında da bozulmalara sebep olduğu gözlenmiştir.

Öneriler:

* Saflaştırılan kitinaz enzimi sonraki çalışmalarda immobilize edilip kararlı hale getirilebilir.

* Enzimin bir ekspresyon vektörüne klolanarak kısa sürede ve daha az maliyetle bolca üretilmesi sağlanabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

* Saflaştırılan enzim kararlı hale getirilip üretildikten sonra formüle edilerek çevre dostu ve sağlığa zararı olmayan, özellikle biyoteknolojik olarak tarımda ciddi sorun olan fungal hastalık etmenleri ile zararlılara karşı, etkili bir ticari ürüne dönüştürülebilir. Bu bağlamda çalışma sonuçlarının da dikkate alınarak ileride yapılacak çalışmalarla ülkemizdeki yerli üretime de katkı sağlanması mümkün görülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abeles, F. B., Bosshart, R. P., Forrence, L. E. and Habig, W. H. 1971. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. *Plant Physiology*, 47(1), 129-134.
- Adapa, V., Ramya, L. N., Pulicherla, K. K. and Rao, K. S. 2014. Cold active pectinases: advancing the food industry to then extgeneration. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2324-2337.
- Adıgüzel, A. 2006. Bazı termal tesislerden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, 133, Erzurum.
- Aehle, W. 2004. *Enzymes in industry: production and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 484, Germany.
- Agrawal, T. and Kotasthane, A. S. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *SpringerPlus*, 1(1), 1-10.
- Aliabadi, N., Aminzadeh, S., Karkhane, A. A. and Haghbeen, K. 2016. Thermostable chitinase from *Cohnella* sp. A01: isolation and product optimization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 931-940.
- Annamalai, N., Giji, S., Arumugam, M. and Balasubramanian, T. 2010. Purification and characterization of chitinase from *Micrococcus* spp. AG84 isolated from marine environment. *African Journal of Microbiology Research*, 4(24), 2822-2827.
- Arslan, S. 2017. Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan beyaz peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 116, Erzurum.
- Baltacı, M. Ö. 2015. Erzurum mezbahalarından toplanan işkembe örneklerinden selülitik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 102, Erzurum.
- Banerjee, G., Ray, A. K. 2017. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 119-143.
- Bell, A. A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 32, 21-81
- Beltagy, E. A., Rawway, M., Abdul-Raouf, U. M., Elshenawy, M. A. and Kelany, M. S. 2018. Purification and characterization of theromohalophilic chitinase producing by halophilic *Aspergillus flavus* isolated from SuezGulf. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(3), 227-232.
- Bhagavan, N. V. and Ha, C. E. 2011. *Essentials of medical biochemistry: with clinicalcases*. Academic Press, London.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A. and Gupta, R. K. 2007. Bacterial chitinases: Poperties and potential, *Critical Reviews in Biotechnology*, 27, 21-28.

- Bhattacharya, S., Das, A., Samadder, S. and Rajan, S. S. 2016. Biosynthesis and characterization of a thermostable, alkali-tolerant chitinase from *Bacillus pumilus* JUBCH08 displaying antagonism against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. 3 Biotech, 6(1), 87.
- Bhushan, B. and Hoondal, G. S. 1998. Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. Biotechnology Letters, 20(2), 157-159.
- Brzezinska, M. S., Jankiewicz, U. and Walczak, M. 2013. Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. International Biodeterioration & Biodegradation, 84, 104-110.
- Cheba, B. A., Zaghloul, T. I., EL-Massry, M. H. and EL-Mahdy, A. R. 2016. Effect of metal ions, chemical agents, and organic solvent on *Bacillus* sp. R2 chitinase activity. Procedia Technology, 22, 465-470.
- Çiçek, A. 2019. *Punica granatum* Spp. (Hicaz narı)'den elde edilen nar ekşisinin *Stenotrophomonas maltophilia* üzerine etkisi ve nar atıklarının biyolojik aktivitesi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, 75, Gaziantep.
- Çiftçi, M., Adıgüzel, A., Erat, M. ve Şahin, M. 2004. *Bacillus* sp. (BA-142) bakterisinden glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin kısmen saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 35 (4), 151-158.
- Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R. P. and Singh Hoondal, G. 2005. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern. Electronic Journal of Biotechnology, 8(2), 14-25.
- De-hui, D. A. I., Wei, L. I., Wei-lian, H. U. and Xiao-ying, S. A. 2011. Effect of medium composition on the synthesis of chitinase and chitin deacetylase from thermophilic *Paenibacillus* sp. Hul. Procedia Environmental Sciences, 8, 620-628.
- Dey, K. K. and Ghosh, M. 2020. Understanding the effect of deacetylation on chitin by measuring chemical shift anisotropy tensor and spinlattice relaxation time. Chemical Physics Letters, 738, 136782.
- Donderski, W. and Brzezinska, M. S., 2005. The Influence of Heavy Metals on the Activity of Chitinases Produced by Planktonic, Benthic and Epiphytic Bacteria. Polish Journal of Environmental Studies, 14(6).
- Dutta, P. K., Dutta, J. and Tripathi, V. S. 2004. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. Journal of Scientific & Industrial Research, 63, 20-31.
- Farag, A. M., Abd-Elnabey, H. M., Ibrahim, H. A. and El-Shenawy, M. 2016. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 42(2), 185-192.
- Flach, J., Pilet, P.E. and Jolles, P. 1992. What's new in chitinase research? Experientia, 48(8), 701-716.
- Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G. and Bahl, H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. Archives of Microbiology, 176(6), 421-426.

- Funkhouser, J. D. and Aronson, N. N. 2007. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 1-16.
- Gallagher, S. R. and Wiley, E. A. (Ed.), 2008. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. John Wiley & Sons, Inc. 737. Massachusetts.
- Gangwar, M., Singh, V., Pandey, A. K., Tripathi, C. K. M. and Mishra, B. N. 2016. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces violascens* NRRL B2700. *Indian Journal of Experimental Biology*, 54(1), 64-71.
- Gilbert, H. J. and Hazlewood, G. P. 1993. Bacterial cellulase and xylanases. *Microbiology*, 139(2), 187-194.
- Gooday, B.W. 1977. Biosynthesis of the fungal cell wall-mechanisms and implications. *Journal of General Microbiology*, 99(1), 1-11.
- Görmez, A. 2011. Erzurum ilinde kayısı ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas* türlerinin tanısı, karakterizasyonu ve çeşit reaksiyonları. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, 197, Erzurum.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S. and Rai, V. 2013. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013, 329121.
- Ha, C.-E. and Bhagavan, N. 2011. *Essentials of medical biochemistry: with clinical cases*. Academic Press.
- Hacıabdullahoğlu, S. N. 2018. Lor peynirinden elde edilen *Lactobacillus coryniformis*'in kitinaz aktivitesinin belirlenmesi ve *Alternaria alternata* üzerine etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, 54, Erzurum.
- Hoster, F., Schmitz, J. E. and Daniel, R. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), 434-442.
- Jankiewicz, U., Brzezinska, M. S. and Saks, E. 2012. Identification and characterization of a chitinase of *Stenotrophomonas maltophilia*, a bacterium that is antagonistic towards fungal phytopathogens. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(1), 30-35.
- Jankiewicz, U. and Brzezinska, M. S. 2015. Purification, characterization, and gene cloning of a chitinase from *Stenotrophomonas maltophilia* N4. *Journal of Basic Microbiology*, 55(6), 709-717.
- Jankiewicz, U., Baranowski, B., Brzezinska, M. S. and Frąk, M. 2020. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Stenotrophomonas rhizophila* G22. *3 Biotech*, 10(1), 1-10.
- Jeuniaux, C. 1966. Chitinases. In *Methods in Enzymology*. Elsevier, 644-650.
- Jones, M., Kujundzic, M., John, S. and Bismarck, A. 2020. Crab vs. Mushroom: A review of crustacean and fungal chitin in wound treatment. *Marine Drugs*, 18(1), 64.

- Joo, G. J. 2005. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters*, 27(19), 1483-1486.
- Jungbauer, A. and Hahn, R. 2009. Ion-exchange chromatography. *Methods in Enzymology*, 463, 349-371.
- Kamil, Z., Rizk, M., Saleh, M. and Moustafa, S. 2007. Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. *Global Journal of Molecular Sciences*, 2(2), 57-66.
- Karthik, N., Binod, P. and Pandey, A. 2015. Purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp. *Bioresource Technology*, 188, 195-201.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. 2009. *Biyokimya. Aktif yayınevi*, 89-137, Ankara.
- Köse, E. 2015. Yapısında birden fazla fonksiyonu barındıran hetero nano-enzim yapılar ve elısa uygulamaları. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, 62, Eskişehir.
- Kuhad, R. C., Gupta, R. and Singh, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 2011, 280696.
- Kumar, M. N. R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27.
- Kumaran, E., Mahalakshmi Priya, A. and Sentila, R. 2013. Effect of fish was tebased *Bacillus* protease in silver recovery from waste X-ray films. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(3), 49-56.
- Kuzu, S. Ç. 2008. Kitinaz üreten *Bacillus* izolasyonu, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, 93, Adana.
- Lee, Y. S., Park, I. H., Yoo, J. S., Chung, S. Y., Lee, Y. C., Cho, Y. S. and Choi, Y. L. 2007. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101. *Bioresource Technology*, 98(14), 2734-2741.
- Li, J., Zheng, J., Liang, Y., Yan, R., Xu, X. and Lin, J. 2020. Expression and characterization of a chitinase from *Serratia marcescens*. *Protein Expression and Purification*, 171, 105613.
- Lineweaver, H. and Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658-666.
- Liu, C. L., Shen, C. R., Hsu, F. F., Chen, J. K., Wu, P. T., Guo, S. H., Lee, W. C., Yu, F. W., Mackey, Z. B., Turk, J. and Gross, M. L. 2009. Isolation and identification of two novel SDS-resistant secreted chitinases from *Aeromonas schubertii*. *Biotechnology Progress*, 25(1), 124-131.
- Liu, K., Ding, H., Yu, Y. and Chen, B. 2019. A cold-adapted chitinase-producing bacterium from antarctica and its potential in biocontrol of plant pathogenic fungi. *Marine Drugs*, 17(12), 695.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. 1997. Brock Biology of Microorganisms. Prentice hall, ABD.
- Mander, P., Cho, S. S., Choi, Y. H., Panthi, S., Choi, Y. S., Kim, H. M. and Yoo, J. C. 2016. Purification and characterization of chitinase showing antifungal and biodegradation properties obtained from *Streptomyces anulatus* CS242. Archives of Pharmacal Research, 39(7), 878-886.
- Mathivanan, N., Kabilan, V. and Murugesan, K. 1998. Purification, characterization and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. Canadian Journal of Microbiology, 44, 646-651.
- Matsumoto, K. S. 2006. Fungal chitinases. Advances in Agricultural and Food Biotechnology, 289-304.
- McCreath, K. J. and Gooday, G. W. 1992. A rapid and sensitive microassay for determination of chitinolytic activity. Journal of Microbiological Methods, 14(4), 229-237.
- Menendez, E., Garcia-Fraile, P. and Rivas, R., 2015. Biotechnological applications of bacterial cellulases. AIMS Bioengineering, 2(3), 163-182.
- Negi, S. and Banerjee, R. 2009. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. Food Research International, 42(4), 443-448.
- Nelson, D. L, Cox, M. M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry, Chapter 6. W. H. FREEMAN, Fourth Edition.
- Önal, S., Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B. 2010. Enzimler, Bölüm 8. Moleküler Biyoloji, Ankara, 249-296.
- Özgen, A. 2011. *Serratia marcescens* kitinaz B ve C genlerinin ekspresyonu ve *Galleria mellonella*'ya karşı insektisidal aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, 2011, 78, Trabzon.
- Özkan, İ. 2020. Termofilik bakterilerden lipaz üreticisi suşların belirlenmesi, enzimin saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulanabilirliğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 103, Erzurum.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnology and applied biochemistry, 31(2), 135-152.
- Patil, R. S., Ghormade, V. and Deshpande, M.V. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. Enzyme and Microbial Technology, 26(7), 473-483.
- Paul, G. C., Kent, C. A. and Thomas, C. R. 1993. Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis. Biotechnology and Bioengineering, 42(1), 11-23.
- Pleban, S., Chernin, L. and Chet, I. 1997. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. Lett. Appl. Microbiol, 25, 284-288.
- Priya, C. S., Jagannathan, N. and Kalaichelvan, P. T. 2011. Production of chitinase by *Streptomyces hygroscopicus* VMCH2 by optimisation of cultural conditions. International Journal of Pharma and BioSciences, 2(2), 210-219.

- Ramirez, M. G., Avelizapa, L. R., Avelizapa, N. R. and Camarillo, R. C. 2004. Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrateto select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 213-219.
- Ray, L., Panda, A. N., Mishra, S. R., Pattanaik, A. K., Adhya, T. K., Suar, M. and Raina, V. 2019. Purification and characterization of an extracellular thermo-alkali stable, metal tolerant chitinase from *Streptomyces chilikensis* RC1830 isolated from a brackish water lake sediment. *Biotechnology Reports*, 21, e00311.
- Rifaat, H. M., Nagieb, Z. A. and Ahmed, Y. M., 2006. Production of xylanases by *Streptomyces* species and their bleaching effect on ricestrawpulp. *Applied Ecology and Environmental Research*, 4(1), 151-160.
- Roberts, W. K. and Selitrennikoff, C. P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology*, 134: 169-176.
- Ruiz-Sánchez, A., Cruz-Camarillo, R., Salcedo-Hernández, R. and Barboza-Corona, J. E. 2005. Chitinases from *Serratia marcescens* Nima. *Biotechnology Letters*, 27(9), 649-653.
- Rüzgar, D. 2019. *Bacillus licheniformis* OSBS6'dan amilaz ve proteaz enzimlerinin üçlü faz ayırma sistemi (TPP) ile saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 137, Erzurum.
- Sabotič, J. and Kos, J. 2012. Microbial and fungal protease inhibitors current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(4), 1351-1375.
- Sandalli, C., Kacagan, M., Canakci, S. and Belduz, A. O. 2008. Cloning, expression, purification and characterisation of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* A1. *Annals of Microbiology*, 58(2), 245-251.
- Sarı, B. 2016. Rize Ayder kaplıcalarından alınan su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu, ksilanaz enziminin *Geobacillus galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılması ve karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 101, Erzurum.
- Saygılı, H. 1995. Fitobakteriyoloji. Ege Üniversitesi, 203, İzmir.
- Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N. and Kotan, R., 2014. Purification of chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13(1), 1-7.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. and Jeon, Y. J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science Technology*, 10(2), 37-51.
- Shaikh, S. A. and Deshpande, M. V. 1993. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(4), 468-475.
- Shali, A., Ghasemi, S., Ahmadian, G., Ranjbar, G., Dehestani, A., Khalesi, N. and Vahed, M. 2010. *Bacillus pumilus* SG2 chitinases induced and regulated by chitin, show inhibitory activity against *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana*. *Phytoparasitica*, 38(2), 141-147.

- Sharma, B., Kumar, P., 2009. In vitro antifungal potency of some plant extracts against *Fusarium oxysporum*. International Journal of Green Pharmacy, 3(1), 63-65.
- Shivakumar, S., Karmali, A. N. ve Ruhimbana, C. 2014. Partial purification, characterization, and kinetic studies of a low-molecular-weight, alkali-tolerant chitinase enzyme from *Bacillus subtilis* JN032305, a potential biocontrol strain. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 44(6), 617-632.
- Shubakov, A. A. and Kucheryavikh, P. S. 2004. Chitinolytic activity of filamentous fungi. Applied Biochemistry and Microbiology, 40(5), 445-447.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P.K. 2016 Microbial enzymes: industrial progress in 21 st century.3 Biotech, (2), 1-15.
- Sowmya, B., Gomathi, D., Kalaiselvi, M., Ravikumar, G., Arulraj, C. and Uma, C. 2012. Production and Purification of Chitinase by *Streptomyces* sp. from Soil. Journal of Advanced Scientific Research, 3(3), 25-29.
- Suma, K. and Podile, A. R. 2013. Chitinase A from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities. Bioresource Technology, 133, 213-220.
- Taechowisan, T., Peberdy, J. F. and Lumyong, S. 2003. Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. Annals of Microbiology, 53(4), 447-462.
- Tarakçioğlu, S. 2016. Erzurum Ilıca kaplıcalarından alınan su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 izolatından lipaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, 121, Erzurum.
- Thamthiankul, S., Suan-Ngay, S., Tantimavanich, S. and Panbangred, W. 2001. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*. Applied Microbiology and Biotechnology, 56(3), 395-401.
- Toharisman, A., Suhartono, M. T., Spindler-Barth, M., Hwang, J. K. and Pyun, Y. R. 2005. Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(5), 733-738.
- Wen, C. M., Tseng, C. S., Cheng, C. Y., and Li, Y. K. 2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. Biotechnology and Applied Biochemistry, 35(3), 213-219.
- Yakupoglu, M. 2009. *Helicoverpa armigera*'dan izole edilen *Serratia marcescens* bakterisine ait kitinaz A, B ve C genlerinin klonlanması, karakterizasyonu, ekspresyonu ve enzim aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, 67, Trabzon.
- Yan, Q., and Fong, S. S., (2018). Cloning and characterization of a chitinase from *Thermobifida fusca* reveals Tfu_0580 as a thermostable and acidic endochitinase. Biotechnology Reports, 19: e00274.
- Yang, S., Fu, X., Yan, Q., Guo, Y., Liu, Z. and Jiang, Z. 2016. Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. Food Chemistry, 192, 1041-1048.

- Yayaylar, Ö. İ. 2019. *Beauveria bassiana* izolatlarından kitinaz enzimi eldesi ve bazı zararlı böceklerle etkisinin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, 106, Ankara.
- Yılmaz, G. 2019. Antifungal ajan adayı olarak bakteriyel kitinaz üretimi ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, 76, Tokat.
- Yuli, P. E., Suhartono, M. T., Rukayadi, Y., Hwang, J. K. and Pyun, Y. R. 2004. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the indonesian *Bacillus* sp. 13.26. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 147-153.
- Zhang, Z., Yuen, G. Y., Sarath, G. and Penheiter, A. R. 2001. Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Phytopathology*, 91(2), 204-211.



EKLER

EK-1 *Stenotrophomonas maltophilia* 16S rRNA Sekans Dizisi

>>ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAAC
ACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGGCGAGT
GGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTCGTGGGGGATAACG
TAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGA
TCTTCGGACCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCG
GGGTAAAGGGCCCAACCAAGGCGACGATCCGTTAGCTGGTCTGAGAGGAAG
ATTCAGNCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGT
GGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCC
AGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGC
TAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTCGTTTAAGTCCGTTGTGAAA
GCCCTGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAATGTG
GTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGG
AGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACATTGACACTGAGGC
ACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
AAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCT
AACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAAGTTCAGAGA
TGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
GCTCGTGTCTGGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGACCGCAACCCTTGT
CCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGGGGGGAACTCTAAGGAAACCGCCGGTG
ACAAACCCGGAAGAAAGGTGGGGGATGAACGTCAAGTCATTCATGGGCCCT
AACGGCCAGGGCTNACACACGTACTACNNAAGGGGAGGGACAGANNGGGC
TGCAAGCCCGGCGACGGGGAAGCTTCAATCCAGAAACCTATCTCAGTCC
GGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
AGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
TCACACGGTACCATA