

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***HELICOVERPA ARMIGERA*'DAN İZOLE EDİLEN *SERRATIA MARCESCENS*
BAKTERİSİNE AİT *KITINAZ* A, B VE C GENLERİNİN KLONLANMASI,
KARAKTERİZASYONU, EKSPRESYONU VE ENZİM AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehtap YAKUPOĞLU

**AĞUSTOS 2009
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***HELICOVERPA ARMIGERA*'DAN İZOLE EDİLEN *SERRATIA MARCESCENS*
BAKTERİSİNE AİT *KITİNAZ* A, B VE C GENLERİNİN KLONLANMASI,
KARAKTERİZASYONU, EKSPRESYONU VE ENZİM AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Mehtap YAKUPOĞLU

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20 Temmuz 2009
Tezin Savunma Tarihi : 14 Ağustos 2009**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Figen CELEP**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU
Trabzon 2009**

ÖNSÖZ

“*Helicoverpa armigera* orjinli *Serratia marcescens*’den elde edilen kitinaz A, B ve C genlerinin klonlanması, karakterizasyonu, ekspresyonu, ve enzim aktivitelerinin belirlenmesi başlıklı” bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, çalışmam boyunca değerli fikirlerini benden esirgemeyen ve tüm imkânları sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a ve tez jüri üyelerinden Doç Dr. Figen CELEP hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. İsmail DEMİR’e, Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, Arş. Gör. Hacer MURATOĞLU’na, tez süresi boyunca laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan sayın Biyoloji Bölüm başkanı Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, değerli arkadaşlarım Emine ERYÜZLÜ’ye, Şerife İŞÇİ’ye, Arş. Gör. Yeşim AKTÜRK’e, Arş. Gör. Emine DEMİR’e, Zeliha CEVHER’e, Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarları çalışanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Bana her zaman inanan ve varlıklarıyla bana her zaman güç veren sevgili babama, anneme, ablam Meriç AYDIN’a ve hayatı boyunca hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen nişanlım Murat DANIŞMAZOĞLU’na sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca çalışmalarımın yürütülmesinde maddi destek sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu’na teşekkür ediyorum.

Mehtap YAKUPOĞLU
Trabzon 2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Enzimleri Yapısı	2
1.3. Enzimlerin Kullanım Alanları	3
1.4. Biyolojik Kontrol ve Kitinazın Hedef Olarak Kullanılması.....	4
1.5. Kitin Degredasyonu	5
1.5.1. Kitin.....	5
1.5.2. Kitinazlar	8
1.6. <i>Serratia marcescens</i> ve Ürettiği Kitinazlar	10
1.7. <i>Serratia marcescens</i> 'in Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak Kullanılması.....	12
1.8. Çalışmanın Amacı	13
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	14
2.1. Bakteri İzolasyonu	14
2.2. Bakteriyal İzolattan DNA İzolasyonu	14
2.3. 16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Çoğaltılması	15
2.4. 16S rRNA Geninin Baz Dizisinin Belirlenmesi ve Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması	15
2.5. Kitin Testi.....	16
2.6. Kolloidal Kitinin Hazırlanması.....	16
2.7. Agar Difüzyon Metodu	16

2.8.	<i>kitinaz</i> Genlerinin PCR Aracılığıyla Belirlenmesi.....	17
2.8.1.	<i>kitinaz</i> Genlerinin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması.....	18
2.9.	<i>kitinaz</i> A, B ve C Genlerinin PGEM-T Easy Vektörüne Klonlanmaları	18
2.10.	<i>kitinaz</i> A, B ve C Genlerinin Elektrokompotent <i>E.coli</i> DH10 β 'ya Aktarımı	18
2.11.	Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi	19
2.12.	Klonların İçerdiği DNA Parçalarının Dizi Analizi	20
2.13.	Elde Edilen DNA Baz Dizilimlerinin İncelenmesi	20
2.14.	<i>kitinaz</i> A, <i>kitinaz</i> B ve <i>kitinaz</i> C Genlerinin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	20
2.14.1.	pET-28a(+) Ekspresyon Vektörünün <i>Nde</i> I, <i>Bam</i> HI ve <i>Nde</i> I, <i>Hind</i> III Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi.....	21
2.14.2.	<i>kitinaz</i> Genlerinin PGEMT-Easy Klonlama Vektöründen Kesilerek Çıkarılması.....	21
2.14.3.	<i>kitinaz</i> A, B ve C Genlerinin pET-28a(+) Vektörüne Aktarımı	22
2.15.	pET-28a(+)’ya Klonlanan <i>kitinaz</i> A, B ve C Genlerinin <i>E.coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Aktarımı	22
2.16.	Kitinaz A, B ve C Proteinleri, Ekspresyonu ve İzolasyonu	22
2.17.	Protein Miktarının Belirlenmesi	23
2.18.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	23
2.19.	Proteinin Saflaştırılması	24
2.20.	Deneylerde Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi	24
2.21.	Enzimlerin Çalıştığı Optimum pH’ların Belirlenmesi	24
2.22.	Enzimlerin Çalıştığı Optimum Sıcaklık’ların Belirlenmesi	24
3.	BULGULAR	26
3.1.	<i>Helicoverpa armigera</i> ’dan Elde Edilen İzolatın 16S rRNA Baz Dizisinin Belirlenmesi.....	26
3.2.	<i>Serratia marcescens</i> Ha İzolatına Ait Agar Difüzyon Metodu ile Genel Kitinaz Taraması.....	26
3.3.	<i>kitinaz</i> Genlerinin PCR Aracılığıyla Belirlenmesi.....	26
3.4.	<i>Serratia marcescens</i> Bakterisinin <i>kitinaz</i> A, <i>kitinaz</i> B ve <i>kitinaz</i> C Genlerinin Klonlanması ve Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi	27
3.5.	<i>Serratia marcescens</i> Bakterisinin <i>kitinaz</i> A, <i>kitinaz</i> B ve <i>kitinaz</i> C Genlerinin Nükleotid Sıralarının Literatür ile Karşılaştırılması	28
3.6.	<i>kitinaz</i> A, B ve C Genlerinin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	30
3.7.	Protein Ekspresyonu ve SDS-PAGE Analizi	32

3.8.	Kitinaz Enzimlerinin Optimum pH'larının Belirlenmesi	36
3.9.	Kitinaz Enzimlerinin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi	37
4.	TARTIŞMA	38
5.	SONUÇLAR	42
6.	ÖNERİLER	43
7.	KAYNAKLAR	44
8.	EKLER	50
ÖZGEÇMİŞ		

ÖZET

Fungal hücre duvarı ve böcek dış iskeleti temel yapı bileşeni olarak kitin içerdiğinden kitinaz enzimleri hem çeşitli bitki hastalıklarına neden olan fitopatojen funguslara hem de zararlı böceklere karşı biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılma potansiyeline sahiptirler.

Bu çalışmada, doğal olarak ölmüş *Helicoverpa armigera* larvasından *Serratia marcescens* bakterisi izole edildi. Bu bakteriden kitinaz A, B ve C enzimlerini kodlayan genler (*chiA*, *chiB* ve *chiC*) dejenerat primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltılan genlerin nükleotid dizilimini belirlemek için PCR ürünleri pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı ve dizin analizine gönderildi. Dizin analizi yapılan *kitinaz* A, B ve C genlerinin DNA ve aminoasit sıraları literatürdeki mevcut *kitinaz* genlerinin DNA ve aminoasit sıraları ile karşılaştırıldı.

Analiz sonuçları bu çalışmada izole edilmiş *S. marcescens* bakterisine ait *chiA* geninin literatürde ki *S.marcescens* (BJL200) *chiA* genine %99, *chiB*'nin literatürde ki *S.marcescens* (BJL200) *chiB* genine %97 ve *chiC*'nin ise literatürde ki *S. marcescens chiC1* genine %96 oranında benzer olduğunu gösterdi. Dizin analizi yapılan bu *kitinaz* genleri pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak *Escherichia coli*'de proteinleri ekspres edildi. Ekspres edilen proteinler saflaştırılarak, SDS-PAGE analizine tabi tutuldular. Bu analiz sonucunda *chiA* genine ait 57kDa'luk, *chiB* genine ait 53kDa'luk ve *chiC* genine ait 50kDa'luk protein bantları jel üzerinde belirlendi. Elde edilen enzimlerin en iyi çalıştığı pH ve sıcaklık aralıklarına bakıldı. Buna göre; kitinaz B'nin en iyi pH 9 ve 35°C sıcaklıkta, kitinaz C'nin ise pH 8,5 ve 33 °C sıcaklıkta aktivite gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Serratia marcescens*, *chiA*, *chiB*, *chiC*, Kitinaz üretimi, Protein ekspresyonu, Enzim aktivitesi

SUMMARY

Characterisation, Expression, and Purification, of *Chitinase A, B and C* genes isolated from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their enzyme activity

Chitinases have been shown to be potential agents for biological control of the plant diseases caused by various phytopathogenic fungi and insect pests, because fungal cell walls and insect exoskeletons contain chitin as a major structural component.

In this study, the gene encoding chitinase A (*chiA*), chitinase B (*chiB*) and chitinase C (*chiC*) from *Serratia marcescens* that isolated from naturally died *Helicoverpa armigera* larvae, amplified with degenerate primers by PCR. For identifying the nucleotide sequence of the amplified genes, PCR products were cloned into the pGEM-T Easy cloning vector. Nucleotide sequences of *chitinase A* (*chiA*), *chitinase B* (*chiB*) and *chitinase C* genes and their deduced amino acid sequences were determined and compared with other *chitinase A* (*chiA*), *chitinase B* (*chiB*) and *chitinase C* (*chiC*) genes.

For the analysis results, *chiA*, *chiB* and *chiC* genes belong to *Serratia marcescens* have %99 homology with (BJL200) *chiA* for *chitinase A*, 97% homology with *S.marcescens* (BJL200) *chiB* gene for *chitinase B* and 96% homology with *S.marcescens chiC1* for *chitinase C1*. To express the protein produced by *chitinase A* *chitinase B* and *chitinase C* genes in a different host and detect their activity the genes were cloned into pET-28a(+) expression vector. The proteins expressed in expression vector were isolated, purified and SDS-PAGE analysis of the proteins were performed. 57 kDa protein band belonged to *chiA* gene, 53 kDa protein band belonged to *chiB* gene and 50 kDa protein band belonged to *chiC* gene were observed on polyacrylamide gel.

The enzymes were obtained and their optimum pH and temperature were determined. For this chitinase B has activity at pH 9 and 35°C and chitinase C has activity pH 8,5 ve 33 °C.

Key Words: *Serratia marcescens*, *chiA*, *chiB*, *chiC*, Chitinase production, Expression of protein, Activity of enzyme

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Kitinin moleküler yapısı.....	6
Şekil 2. Grup 18'e ait bakteriyel kitinazların birbirleriyle ilişkileri.....	9
Şekil 3. Grup 18'in katalitik mekanizması.....	10
Şekil 4. <i>Serratia marcescens</i> bakterisine ait agar difüzyon sonucu.....	26
Şekil 5. PCR ile çoğaltılmış <i>kitinaz A</i> , <i>kitinaz B</i> ve <i>kitinaz C</i> genlerinin agaroz jel görüntüsü.....	27
Şekil 6. <i>NdeI</i> ve <i>HindIII</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pET-28a(+) ve <i>chiB</i> 'nin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	30
Şekil 7. <i>NdeI</i> ve <i>BamHI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pET-28a(+) ve <i>chiA</i> 'nin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	31
Şekil 8. <i>NdeI</i> ve <i>BamHI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pET-28a(+) ve <i>chiC</i> 'nin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	31
Şekil 9. <i>E.coli</i> BL21(DE3)'de üretilen <i>kitinaz A</i> genine ait SDS-PAGE analizi.....	33
Şekil 10. <i>E.coli</i> BL21(DE3)'de üretilen <i>kitinaz B</i> genine ait SDS-PAGE analizi.....	34
Şekil 11. <i>E.coli</i> BL21(DE3)'de üretilen <i>kitinaz C</i> genine ait SDS-PAGE analizi.....	35
Şekil 12. Kitinaz B enziminin farklı pH'lardaki aktivitesi.....	36
Şekil 13. Kitinaz C enziminin farklı pH'lardaki aktivitesi.....	36
Şekil 14. Sıcaklık-kitinaz B grafiği.....	37
Şekil 15. Sıcaklık-kitinaz C grafiği.....	37

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Farklı organizmalarda bulunan kitin oranları.....	7
Tablo 2. <i>S.marcescens</i> 'deki kitinazlar ve kitin bağlanma proteini	12
Tablo 3. <i>kitinaz</i> genlerine ait primer dizileri.....	17
Tablo 4. <i>kitinaz</i> A genine ait nükleotid sıralarının karşılaştırma sonuçları	28
Tablo 5. <i>kitinaz</i> B genine ait nükleotid sıralarının karşılaştırma sonuçları	29
Tablo 6. <i>kitinaz</i> C genine ait nükleotid sıralarının karşılaştırma sonuçları	29

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bp	: Baz çifti
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
DNS	: Dinitrosalisilik asit
dNTP	: Deoksinükleosit trifosfat
chi	: Kitinaz
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosit
kDa	: Kilo dalton
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil β -D-galaktopiranosid

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmada oluşan tüm reaksiyonların hızlı bir şekilde koordine edilmesini sağlayan protein ana yapılı spesifik biyokatalizörlerdir. Tüm canlılarda bulunan bu enzimler hücrelerde gerçekleşen birçok biyokimyasal reaksiyonun katalizini canlı hücreye zarar vermeden ve hızlı bir şekilde gerçekleştirir. Enzimler metabolizmada yapım, yıkım, hidroliz, elektron aktarımı gibi olaylarda görev alırlar. Kimyasal katalizörlere kıyasla sahip oldukları katalitik güç, spesifiklik ve düzenlenebilirlik özelliklerinden dolayı da avantajlı moleküllerdir. Uygun koşulların sağlanması durumunda enzimler *in vitro* olarak da katalitik etki gösterebildikleri için pek çok alanda da kullanılabilirler.

Enzimler binlerce yıl öncesinden bu yana insanlığa hizmet etmiş olup ilk biyoteknolojik işlemler olarak kabul edilen ekmek, yoğurt, bira, şarap, peynir gibi ürünlerin hazırlanmasında bilinmeden kullanılmışlardır. Geçtiğimiz yüzyıldan itibaren ise enzim alanında yapılan çalışmalar arttırılmıştır. Spallanzani (1783) tarafından atmaca mide suyunun eti yumuşattığının bulunması, Kirchoff (1811)'un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi, Robiquet, Boutron ve Chaland (1830)'ın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini keşfetmeleri, Payen ve Persoz (1833)'un nişastayı şekere dönüştüren bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmeleri ve hücre dışı enzimatik aktivitenin varlığının anlaşılması enzimoloji alanında yapılan ilk temel çalışmalar olmuştur (Aehle, 2004).

Enzimler keşfedildikleri ilk yıllarda *ferment* olarak adlandırılmış olsa da ilk kez Berzelius (1838) enzimler için *katalizör (biyokatalizör)* ifadesini kullanmış ve ardından Künhe (1878) *enzim* terimini kullanan ilk kişi olmuştur. 1800'lü yılların sonuna doğru Emil Fischer enzimlerin substratlarına olan özgünlüklerini ortaya koyarak anahtar-kilit modelini tanımlamış ve bazı temel kavramların enzimoloji alanına girmesini sağlamıştır. Summer (1926)'ın kristalize formda üreaz enzimini ilk olarak elde etmesiyle enzim saflaştırma ve kristallendirme çalışmaları hız kazanmıştır. 1950 yılına dek pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi proteolitik enzimlerin bulunduğu pek çok enzim saflaştırılarak kristalize edilmiştir. Svedberg tarafından gerçekleştirilen ultrasentrifüj tekniği ile enzimlerin molekül kütlelerine göre ayırımının yapılabileceğinin belirtilmesi, 1960 yılında rübonükleazın aminoasit dizisinin

aydınlatılması, 1965 yılında lizozimin 3 boyutlu yapısının X-ışınları kristalografisi ile belirlenmesi enzimlerin kimyası ve yapısı alanındaki ilk çalışmalar olmuştur. 1950-1960 yılları arasında yapılan enzimolojik çalışmalardan enzimlerin yapısal esnekliği ile ilgili bilgiler ortaya çıkmış ve 1958 yılında Koshland, enzimlerin katalitik gücü ve özgünlüğünü açıklamak üzere indüklenmiş uyum (induced fit) modelini önermiştir. Aminoasit prekürsörlerinden ribonükleaz enziminin kimyasal olarak sentezi ilk kez Merrifield ve arkadaşları (1969) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu alanda yapılan önemli bir gelişme olmamasına rağmen hazırlanan preparatın katalitik aktivitesi ve kimyasal saflığı oldukça düşük olmuştur. Enzimler kullanım amaçlarına göre 3 grupta toplanabilirler.

1-Üretime yönelik çeşitli reaksiyonların katalizinde kullanılan saflık dereceleri düşük olan *endüstriyel enzimler*,

2-Bilimsel araştırma ve analitik amaçla kullanılan saflık dereceleri yüksek *analitik enzimler*,

3-Çeşitli fizyolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan ve saflık derecesi oldukça yüksek *linik enzimler*.

1.2. Enzimlerin Yapısı

Enzimler kimyasal yapı bakımından protein ana yapılu moleküllerdir. Fakat bazı enzimlerde, proteine, protein olmayan daha küçük organik veya anorganik moleküllerin bağlanmasıyla oluşmuş *proteid* yapısı da söz konusudur. Enzimin sadece proteinden oluşmuş ve kofaktörleri içermeyen inaktif kısmına *apoenzim*, tüm kofaktörleri ve koenzimleri içeren katalitik aktif kısmına ise *haloenzim* denir. Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için gerekli olan, protein yapıda olmayan, genellikle metal iyonlarından (Fe^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} gibi) oluşan yan gruplarına *kofaktör* denir. *Koenzim* ise, enzimlerin aktivite gösterebilmek için gereksinim duydukları kompleks organik moleküllerdir.

Enzimlerin protein kısmı diğer doğal proteinlerde olduğu gibi 20 doğal amino asitin peptid bağlarıyla bağlanması sonucu oluşmuştur. Ancak çoğu enzimde, translasyon sonrası modifikasyonlar sonucu protein zincirinde yer alan amino asitlerin yan zincirlerinde (R-grupları) bazı kimyasal değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu durumda protein zincirine karbonhidrat, lipid, çeşitli organik moleküller veya metal iyonları bağlanmaktadır. Enzimlerin yapılarının aydınlatılmasında ilk adım *primer (birincil)* yapısının yani protein kısmının amino asit diziliş sırasının aydınlatılmasıdır. Doğal proteinlerin yapısına giren 20 amino asit

mevcuttur ve bunlar birbirlerine kovalent olarak peptid bağları ile bağlanırlar. İkinci adım, polipeptid zincirinin yapısındaki amino asitlerin R grupları dikkate alınmaksızın uzaydaki konformasyonu yani *sekonder (ikincil)* yapının belirlenmesidir. İkincil yapının oluşumunda özellikle zincir içi ve zincirler arası oluşan hidrojen köprü bağları önemlidir. Üçüncü adım ise üç boyutlu yapının oluşumunda etkili rol oynayan *tersiyer (üçüncül)* yapının belirlenmesidir. Tersiyer yapı, zincirdeki aminoasitlerin R gruplarının da dikkate alınarak uzaydaki konumunun belirlenmesidir. Bu yapıyı belirleyen başlıca etmenler; hidrojen bağları, disülfid bağları, iyonik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimlerdir. Birden fazla alt birim (peptid zinciri)den oluşan enzimler de (oligomerik yapı) dördüncü adım *kuarter (dördüncül)* yapının aydınlatılmasıdır. Dördüncül yapı, alt birimler arasındaki ilişki ve toplam molekülün uzaydaki konformasyonudur. Böyle bir enzimin alt birimleri varyasyonu ile *izoenzimler* türer. İzoenzimler, *izozimler* olarak da adlandırılır ve aynı reaksiyonu katalizleyen, farklı birincil yapıya sahip, aynı organizmada oluşan iki ya da daha fazla enzimdir. Enzimlerin 3 boyutlu yapıları günümüzde x-ışınları kristalografisi ile ayrıntılı olarak aydınlatılabilmektedir. Bunun için öncelikle enzimin saf kristalize formuna ve primer yapı bilgisine ihtiyaç duyulur. Enzimlerin etki ettiği maddelere *substrat* denir. Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği bir merkez bulunur. Bu merkez *aktif merkez* olarak adlandırılır ve daima bir oluk veya yarık şeklindedir.

Aktif merkezde yer alan aminoasitlerin bir kısmı substratın buraya doğru olarak bağlanmasını sağlar. Bağlanmada etkin olan kuvvetler hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik etkileşimler ve kovalent bağlardır. Aktif merkezde substratın bağlandığı bir *bağlanma bölgesi* ve bir de katalitik dönüşüme uğrattığı *katalitik aktivite* bölgesi bulunur (Yıldırım vd., 2007).

1.3. Enzimlerin Kullanım Alanları

Enzimlerin önemli bir uygulama alanı endüstrideki kullanımlarıdır. Çünkü, klasik kimyasal katalizörlere göre endüstriyel katalizörler olarak enzimler önemli bazı avantajlara sahiptirler (Goodenough vd., 1995). Yüksek düzeyde substrat özgünlüğü, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu elimine ederken materyal maliyetini düşürür ve çevre sorunu yaratmaz.

- Bazı stereoölgün reaksiyonlar enzimler olmadan gerçekleştirilemezler.
- Operasyon koşullarının ısıya duyarlı substratları bozma olasılığını azaltır ve operasyonun korozyon etkilerini ve enerji gereksinimlerini düşürür.

- Reaksiyon hızı yüksek ve maliyeti düşüktür.

Endüstriyel alanda kullanılan enzimlere örnek olarak proteolitik enzimler, amilolitik enzimler, glukoz izomerazlar, pektolitik enzimler, selülozlar ve galaktozidazlar verilebilir.

Enzimlerin diğer bir önemli uygulama alanları klinik amaçlı kullanımlarıdır. Medikal alandaki uygulamalara örnek olarak; genetik bozuklukların, dolaşım hastalıklarının, kanserin, sindirim yetmezliğinin tedavisi, yara temizliği ve tedavisi, ilaç tasarımı verilebilir. Bu amaçla amilaz, papain, pepsin, lipaz, selüloz, tripsin ve ribonükleaz gibi pek çok enzim kullanılmaktadır (Hebeda ve Hui, 1992). Enzimler *in vitro* koşullarda da oldukça etkili katalizörler oldukları için genetik mühendisliğin de vazgeçilmezleridir. Bu alanda kullanılan enzimler, hücrede DNA replikasyonu ve transkripsiyonu, istenmeyen ya da yabancı DNA moleküllerinin yıkımı, mutant DNA'nın onarımı ve rekombinasyon gibi çeşitli yaşamsal olaylarda önemli rol oynamaktadırlar. Genetik mühendisliğinde kullanılan enzimler başlıca 4 grup altında toplanırlar (Favaloro vd., 1980). Nükleazlar; nükleik asit moleküllerini kesen, boylarını kısaltan veya parçalayan enzimlerdir. Bunlar ekzo- ve endonükleazlar, restriksiyon endonükleazlarıdır. Ligazlar; nükleik asitleri birbirine bağlayan enzimlerdir. *E. coli* T4 ligazı gibi. Polimerazlar; nükleik asitlerin kopyalarını hazırlayan enzimlerdir. *E. coli* DNA polimeraz I, reverse transkriptaz, terminal transferaz, termolabil DNA polimeraz gibi. Modifikasyon enzimleri; kimyasal grupları ekleyen ya da ayıran enzimlerdir. Alkali fosfataz, polinükleotid kinaz gibi.

1.4. Biyolojik Kontrol ve Kitinazın Hedef Olarak Kullanılması

Doğada yararlı ve zararlı olarak tanımlanan çeşitli böcek türleri bulunmaktadır. Doğaya ve insana zararlı olan çok az sayıda böcek türü bulunmasına rağmen özellikle bu zararlı böcek türleri tarım alanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hızlı nüfus artışı ile birlikte tarım alanlarında meydana gelen ürün kayıpları ülkemizi her geçen gün dışa bağımlı hale getirmektedir. Zararlı böcek türlerinin oluşturduğu zarar nedeniyle Türkiye birçok ülkeden tarım ürünleri ithal etmektedir.

Zararlı böceklerle mücadelede yaygın olarak kimyasal insektisitler kullanılmaktadır (Lewis vd., 1997). Kimyasal insektisitlerin kullanımı tarımsal üretimin artırılmasında önemli rol oynamaktadır. Fakat kimyasal insektisitlerin uzun süreli ve sık kullanımı insan sağlığını olumsuz etkilemekte ayrıca hedef dışı canlılara etkisi sonucu doğal dengenin bozulmasına neden olmaktadır (Montesinos, 2003). Kimyasal insektisitler hava, toprak ve su kirliliğinin

oluşmasında da etkilidir. Kimyasal ilaçların tarım zararlılarına karşı yüksek dozda ve bilinçsiz kullanımları, bunların kimyasallara karşı direnç kazanmalarına neden olmaktadır.

Cassidy (2005) yaptığı çalışmada, zararlı kimyasallardan olan heptachlor epoxide ve estradiol'ün göğüs kanserini tetiklemeye katkısı olduğunu tespit etmiştir. Schreinemachers (2003) in bir çalışmasında da chlorophenoxy kimyasalının yaygın bir şekilde kullanılmasının doğumda görülen anormalliklere ve bu anormallikler sonucu erken ölümlere yol açtığı belirtilmiştir.

Kimyasalların kullanımı ile gerçekleştirilen zararlı böcek kontrolüne alternatif bir yöntem de biyolojik mücadele yöntemidir. Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını onlara karşı kullanma olarak tanımlanabilir. Biyolojik mücadelede rol oynayan ajanlar genel olarak virüsler, bakteriler, mantarlar, protozoonlar ve nematodlardır.

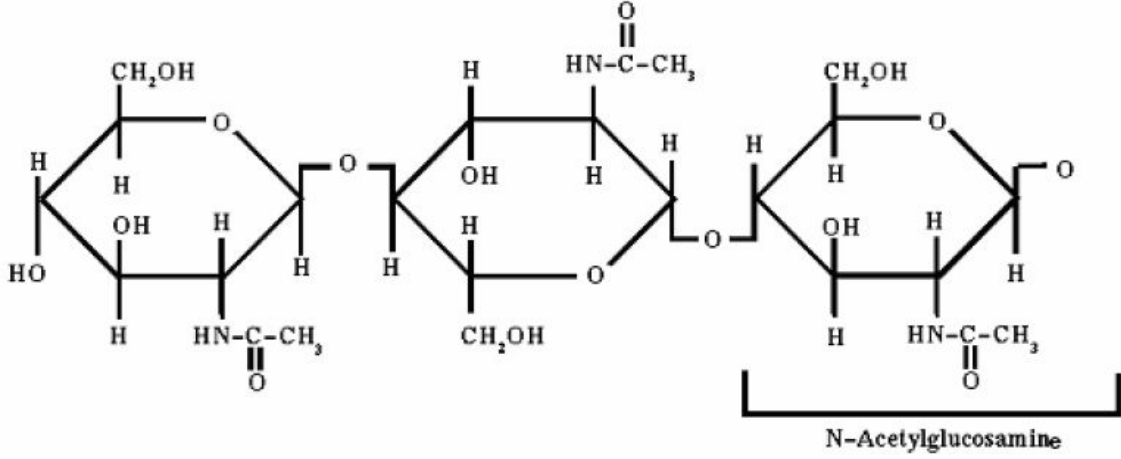
Entomopatojen bakteriler, günümüzde zararlı böceklere karşı en fazla kullanılan mikroorganizmalardır. Bazı bakteriler kitinolitik aktivite göstermektedir. Kitinolitik aktivite gösteren bu bakterilerin bazıları aynı zamanda bitkisel hastalıklara karşı da kullanılmaktadır.

Kitinolitik aktivite gösteren bakteriler arasında en çok bilinen gram negatif bakteriler *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio*, hareketli bakterilerden ise *Chitinophaga*, *Cytophaga* ve *Lasobacter* dir. Gram pozitif bakterilerden yaygın olarak kitin üretenler ise aktinomisetler, örneğin; *Arthrobacter*, *Nocardia*, ve *Streptomyces* cinsleri ve spor üreten cinslerden ise *Bacillus* ve *Clostridium* bulunmaktadır (Thamthiankul vd., 2001).

1.5. Kitin Degredasyonu

1.5.1. Kitin

Kitin, (1,4)- β -bağlı homopolisakkarit *N*-asetilglukozamin (Sampson ve Gooday, 1998; Vaaje-Kolstad vd., 2004; Hoell vd., 2005; Suginta vd., 2005) doğada selülozdan sonra en çok bulunan ikinci biyopolimerdir (Lonhienne vd., 2001; Vaaje-Kolstad vd., 2005). Kitin ve selüloz moleküler olarak birbirlerine çok benzerler, bu nedenle bazen kitinin selülozun bir yan ürünü olabileceği bile düşünülmüştür.. Sadece kitin asetamid içerirken selüloz hidroksi grup içermektedir. Kitinin yapısı Şekil 1. de görülmektedir.



Şekil 1. Kitinin moleküler yapısı (URL-1)

Kitin, diatomelerde, mayalarda, mantarlarda, protozoa, eklem bacaklılarda, böceklerde, kabuklularda, nematotlarda ve diğer omurgasızlarda bulunmaktadır (Trudel ve Asselin 1989). Tablo 1. farklı organizmalardaki kitin oranını göstermektedir. Kitin, böceklerde kutikulun ve çoğu böceğin bağırsağını koruyan peritrofik membranın ana bileşenidir. Bağırsağı enfekte eden patojenlerin öncelikle bu kitince zengin bariyeri geçmeleri gerekmektedir (Shen ve Jacobs-Lorena, 1997; Sampson ve Gooday, 1998; Hoell vd., 2005). Kitini disakkaritlerine veya daha büyük oligosakkaritlere parçalamak kitinaz enzimi vasıtasıyla ekstrasellüler olarak yapılmaktadır (Sitrit vd., 1995).

Kitinin dikkat çekici özelliklerinin bir arada toplanması onu çok yönlü kullanıma uygun hale getirmiştir. Kitin, toksik etki göstermeyen, alerjik olmayan, anti mikrobiyal ve degrede olabilen bir polimer olma özelliğine sahiptir. Güçlü pozitif yüklerinin bulunması, protein gibi makromoleküllere, deriye ve metal içeren negatif yüklü yüzeylere bağlanmasını sağlar.

Okyanuslarda bulunan bazı bakteriler, degrede olmuş deniz kabuklarından oluşan küçük şeker halkalarını algılayabilmektedirler. Bu bakterilerden biri olan *Vibrio furnisii* ile ilgili yapılan bir çalışmada bu bakterilerin bir deniz kabuğu bulup, salgıladıkları enzimlerle bu kabuğu parçaladıkları tespit edilmiştir. Dokuz aşamadan oluşan bu süreç sonucunda bu bakterilerin kitindeki basit şekerleri amonyağı indirgediği belirlenmiştir (URL-2).

Tablo 1. Farklı organizmalarda bulunan kitin oranları

Organizma	Oran
Mantar	5-20
Solucan	20-38
Ahtapot	3-20
Örümcek	38
Hamamböceği	35
İpekböceği	44
Yabani yengeç	69
Yenebilen yengeç	70
Akrep	30
Su böceği	37

Son on yıl boyunca selüloz ve kitin gibi çözünmeyen polimerlerin enzim ve degradasyon mekanizmaları üzerindeki çalışmalar büyük gelişme göstermiştir. Bu yeni bilgi ile doğadaki büyük miktardaki polimerlerin dönüşümün nasıl olduğunu anlamada yardımcı olmaktadır (Brurberg vd., 2000).

Her yıl biyosferde 10 gigaton civarında kitin sentezlenip degrede olmaktadır. Kitin ve ürünlerinin en önemli özelliklerinden biri de yanma sonucu oluşan hastalıkları tedavi etmede kullanılır. Kitin canlı dokularla birlikte çok iyi uyum sağlamaktadır ve böylece yaraları iyileştirme özelliği çok fazla gözlenmektedir.

Kitozan, kitinin enzimatik deasetilasyonu tarafından oluşturulan bir polimerdir (da Silva Amorim vd., 2001). Kitozan, fabrikalar için sağlıklı boyalar yapımında kullanılmaktadır. Hatta medikal firmalar kilo kaybı için kullanılan ürünlerinde de kitozanı kullanmaktadırlar. Kitozanın serum kolestrol seviyesini düşürdüğüne dair deliller bile bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar ise kitozanın tarım ürünlerini arttırdığına ve havuzları temizlediğine dair çalışmaları bulunmaktadır. Sağlık alanında kitozandan oldukça faydalanılmaktadır. Ülser ve lezyonları iyileştirdiği, antibakteriyal olduğu, diş çürümesi ve plak oluşumunu engellediği, kan basıncını kontrol etmeye yardımcı olduğu ve tümör karşıtı rol oynadığı bilinmektedir (URL-3).

1.5.2. Kitinazlar

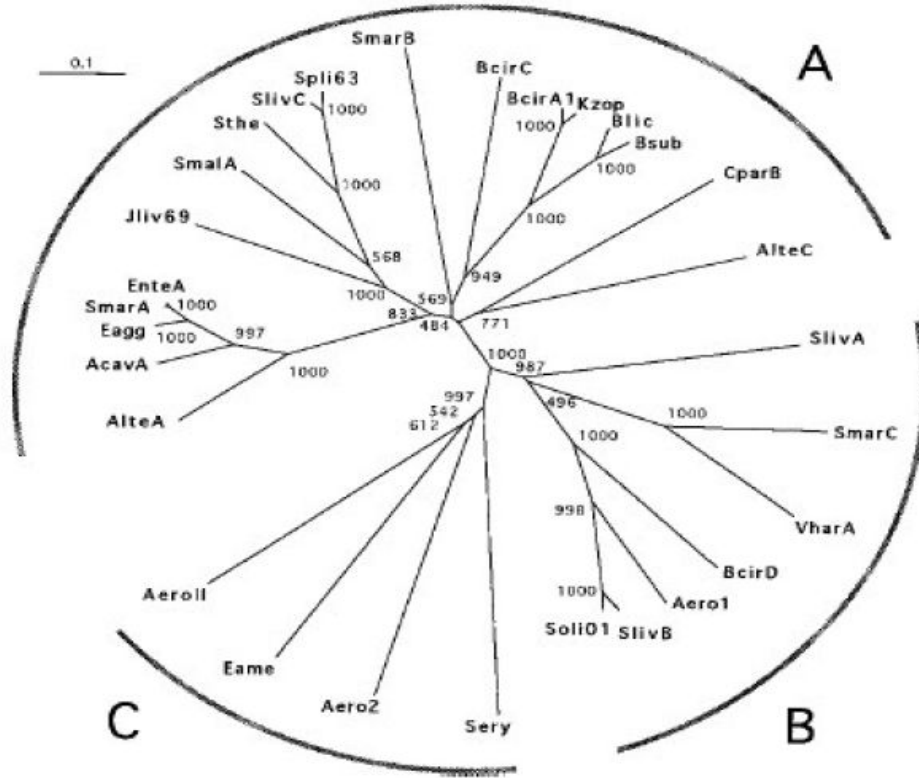
Kitin hidrolizlenmesi iki tip enzim tarafından gerçekleşmektedir İlki büyük enzim olan kitinazlardır [poly- β -1,4-(2-acetamido-2-deoxy)-D-glucoside glycanohydrolases, EC 3.2.1.14]. Kitinazların, *N*-asetilglukozaminin multimerlerini oluşturan endokitinazlar ve polimerin indirgenmemiş ucundan başlayan, düşük moleküler ağırlığa sahip, çözünebilen dimerlerin sürekli salınmasını katalizleyen ekzokitinazlar olmak üzere iki alt grubu bulunmaktadır. İkinci tip enzim ise kitobiozu *N*-asetilglukozamin monomerine hidrolizleyen kitobiazlardır (Roberts ve Selitrennikoff, 1988; Botha vd., 1998; Souza vd., 2003; Ruiz-Sanchez vd., 2005; Suginta vd., 2005).

Kitin içeren tüm organizmalardaki kitinaz enzimi hücre duvarının ve dış iskeletin morfogenezi için gerekmektedir. Kitin içermeyen diğer organizmalar ise yiyeceklerdeki polimerleri degrades ederek kitinaz üretebilmektedirler (Roberts ve Selitrennikoff, 1988).

Bitkiler, kitinazı fungal patojenlere karşı kendilerini korumak için üretirler (Wen vd., 2002). Kitinaz, fungal patojenlerin misellerini parçalar. *kitinaz* geninin bitkilere transferi ile elde edilen transgenik bitkiler fungusid ve insektisid özellikler kazanmakta ve böyle transgenik bitkiler kendileri için patojen funguslarla ve böceklerle savaşabilmektedir. Doğal olarak genotipinde *kitinaz* geni bulunduran bazı bitkiler bilinmektedir. Örn; akçaağaç, siyah, kırmızı ve beyaz meşe ağaçlarının sağlıklı gövde ve kök dokularında β -1,3-glukanaz ve kitinaz varlığı tespit edilmiş ve bu enzimlerin bu ağaçlarda patojen olan *Armillaria mellea*'nin hif çepelerinin erimesine sebep olduğu bildirilmiştir (Muzzarelli, 1977).

Farklı organizmalarda bulunan kitinazların amino asit benzerliklerine bakıldığında beş grup kitinaz mevcuttur. Bu gruplar glikozil hidrolizlenmesine göre grup 18 ve grup 19 olmak üzere iki grup altında toplanırlar. I, II ve IV grubunda olanlar bitki kökenlidir ve grup 19'a aittirler. Grup III' de olanlar bitki ve mantar kökenlidir ve grup V ile birlikte grup 18'i oluşturmaktadırlar. Grup 18 ise yapı olarak grup 19 ile bağlantılı değildir.

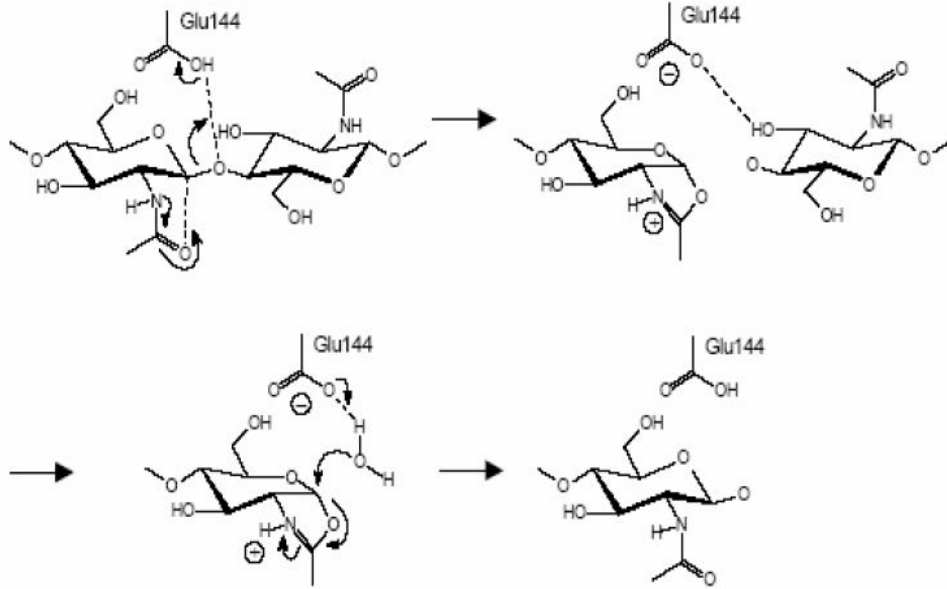
Grup V bakteriyel kitinazları içermektedir. Bakteriler, kitinazı besin ihtiyaçlarını karşılamak için üretmektedirler. Büyük ihtimalle, bakteriler, doğadaki kitin çeşitliliğini (Şekil 2.) hidrolize etmek için çok çeşitte kitinaz üretirler (Cohen-Kupiec ve Chet, 1998).



Şekil 2. Grup 18'e ait bakteriyel kitinazların birbirleriyle ilişkileri. Ağaç köksüzdür. 29 adet kitinaz, CLUSTAL W programında neighbour-joining metodu uygulanarak ve TreeView programı kullanılarak çizilmiştir. Dallarda bulunan numaralar, bootstrap analizinde 1000 tekrar sonucundaki değerleri göstermektedir. Yatay ölçek barındaki 0.1 ise her pozisyondaki amino asit değişikliğini göstermektedir. SmarA: *Serratia marcescens* 2170 kitinaz, EnteaA: *Enterobacter* sp. G-1 kitinaz, Eagg: *Enterobacter agglomerans* kitinaz (Chia-Entag), AcavaA: *Aeromonas caviae* kitinaz, AlteA: *Alteromonas* sp. O-7 kitinaz A (Suzuki vd., 1999).

Grup 18'e ait endokitinazın aktif bölgesinin 3 boyutlu yapısında bakıldığında, uzun ve geniş bir substrat bağlanma bölgesi olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, ekzokitinazın aktif bölgesine bakıldığında, tünele benzer bir morfolojiye sahiptir (Suginta vd., 2004). Grup 18'in katalitik domaini TIM-barrel ($(\beta\alpha_8)$ barrel) katlanmasına sahiptir. TIM barrel de bulunan dört tane β sarmal karakteristik DXDXE motifini içermektedir. Bu motif, oksijeni glikosidik bağlara taşıyan glutamate rezidüsü içermektedir. Katalitik domaine ek olarak bu enzim, küçük

kitin bağlanma domaini de içermektedir (Vaaje-Kolstad vd., 2004). Şekil 3. Grup 18'e ait kitinazların katalitik mekanizmasını göstermektedir.



Şekil 3. Grup 18' deki kitinazların katalitik mekanizması. Glu¹⁴⁴, kitinaz B'de bulunan katalitik glutamat rezidüdür (Brurberg vd., 2000).

Kitinin kitinaz tarafından hidrolizlenmesi, degradasyon sürecinde bakteri tarafından yapılan en kritik aşamadır. Buna rağmen, kitinin bakteri tarafından degrade edilmesi tam olarak aydınlanamamıştır. Bu süreç birçok aşamadan oluşmaktadır.

1.6. *Serratia marcescens* ve Ürettiği Kitinazlar

Gram negatif, fakültatif anaerob, hareketli ve yuvarlak şekilde olan *Serratia* 0,5-0,8X 1,0-5,0 µ boyutundadır. Karakteristik olarak kırmızı pigment üretmekte ve mukusumsu koloniler oluşturmaktadır. Doğal olarak böceklerin bulunduğu toprak ve sularda bulunmaktadır. Patojenitesi daha çok hastane ile ilgili hastalıklarda görülmektedir. Örneğin; solunum ve boşaltım sistemi ile ilgili rahatsızlıklarda, endokard iltihabında, kemik iliği iltihabında, sepsis enfeksiyonlarında, göz enfeksiyonları ve menenjitte görülebilir. Bulaşması ise direkt olarak temas ile olabileceği gibi vücut sıvılarıyla da olabilmektedir. Tedavisi çeşitli antibiyotiklerle yapılabilmektedir. Fakat plazmidlerinde bulunan R-faktörler sayesinde de çoğu antibiyotiğe dirençlilik gösterirler.

Enterobacteriaceae familyasına ait olan *Serratia* cinsi 13 tür içermektedir. Bu türler arasında en çok çalışılan ise *Serratia marcescens*'tir. *Serratia*, yaygın bir şekilde kırmızı pigment üreten organizma olarak anılmaktadır. Yıllarca, *Serratia marcescens*, kırmızı pigment ürettiğinden diğer enterik bakterilerden ayrılmıştır ve bu familyaya ait tek tür olarak bilinmekteydi. Buna rağmen birçok *Serratia* türü pigment üretmemekte veya çok çeşitli pigmentasyona sahiptirler. *Klebsiella* ve *Enterobacter* cinslerine birçok benzerliği bulunmasına rağmen *Serratia* çoğu zaman yanlış tanımlanmaktadır. 1972'den beri diğer gruplar ve kültürlerle yapılan DNA homolojisi ve farklı biyokimyasal karşılaştırma çalışmaları sayesinde cins düzeyinde birçok tür elde edilmiştir. *Serratia marcescens* dışında diğer iyi bilinen türler ise; *S. odorifera*, *S. liquifaciens*, *S. rubidaea*, *S. ficaria*, *S. pymuthica* ve *S. fonticola*'dır. Fakat kitinaz üretimi en çok *Serratia marcescens* tarafından yapılmaktadır.

Serratia marcescens, aşağıda belirtilen sebeplerden dolayı ilgili çalışmalarda kitinaz kaynağı olarak seçilmiştir: (i) *Serratia marcescens*'den elde edilen kaba kitinaz örnekleri ticari amaç için uygundur, (ii) *Serratia marcescens*'den elde edilen kitinaz için saflaştırma yöntemlerinden biri olan affinite kromatografisinin çok etkili olduğu rapor edilmiştir, (iii) kitinaz tarafından kodlanan gen veya genler ve tanımlanan düzenleyici sinyaller sayesinde direkt olarak *E.coli*'de ekspres edilebilmektedir, (iv) *Serratia marcescens*'den elde edilen kitinaz endolitik bir enzim olduğu için ekzolitik enzimlere göre kitini daha kolay çözebilmektedir, (v) *Serratia marcescens*'den elde edilen kitinaz "kristal" haldeki kitini bile hidrolize edebilmektedir (Fuchs vd., 1986).

Serratia marcescens, kitini degrades etmede en etkili bakterilerden biridir (Brurberg vd., 1994; 1995; 1996; 2000; Watanabe vd., 1997; Nawani ve Kpandis, 2001; Suzuki vd., 2001; Uchiyama vd., 2003; Ruiz-Sanchez vd., 2005; Vaaje-Kolstad vd., 2005). Bu bakteri kitin varlığında kültüre edildiği zaman, çeşitli kitinolitik enzimler ve kitin bağlanma proteini belirlenebilir. Yapılan çalışmalar açık şekilde *Serratia marcescens*'in üç çeşit kitinaz (kitinaz A, kitinaz B ve kitinaz C), bir adet kitobiaz ve görevi tam olarak belirlenemeyen bir kitin bağlanma proteini (CBP21) ürettiği görülmektedir. Bu beş protein mantığa uygun gelmekte fakat tam olarak kesinleştirilememiş bulunmaktadır. Bu proteinler bir bakterinin komple kitinolitik mekanizmasını göstermektedir (Tablo 2) (Brurberg vd., 2000; Suzuki vd., 2001).

Tablo 2. *S.marcescens*'deki kitinazlar ve kitin bağlanma proteini (Brurberg vd., 2000).

SDS-PAGE band (kDa)	Gen (protein)	<i>S.marcescens</i> 'deki konumu	N-terminal sinyal peptid
57-58	<i>kitinaz A</i>	Ekstraselüler	Evet
52-54	<i>kitinaz B</i>	Periplazma/ekstraselüler	Hayır
48-52	<i>kitinaz C1</i>	Ekstraselüler	Hayır
35-36	<i>kitinaz C2</i>	Ekstraselüler	Hayır
95	<i>kitobiaz</i>	Periplazma	Evet
21-22	Kitin bağlanma proteini	Ekstraselüler	Evet

S.marcescens'de bulunan *kitinaz* genlerinin organizasyonları tam olarak bilinmemektedir. Hibridizasyon çalışmalarına bakıldığında *kitinaz A* ve *kitinaz B*'yi kodlayan genler yakın olarak bağlanma yapamamaktadırlar. *kitinaz B* ve kitin bağlanma proteini 21 (CBP21)'i kodlayan genler yakın bağlantı kurabilmektedirler; fakat DNA sıralarına bakıldığında bu iki genin transkripsiyonu ikili bir bağlantı kurmamaktadır (Brurberg vd., 2000).

Streptomyces coelicolor'da bulunan sekiz tane *kitinaz* geni kromozom üzerinde dağınık halde bulunmaktadır (Brurberg vd., 2000). Kitin bağlanma proteini 21 (CBP21) kitine bağlanmakta, fakat hidroliz aktivitesi gösterememektedir. Bu protein sadece kitinazın üretilbildiği şartlar altında üretilmektedir (Suzuki vd.,2001).

Bu kitinazlar arasında doğada en çok bulunanı *kitinaz A*'dir. *kitinaz A* diğer kitinazlardan sinyal peptidinin olmasıyla ayrılır. Protein periplazmaya ulaştığı zaman periplazmik sinyal peptidaz tarafından salınan N-terminal sinyal peptide sahiptir (Brurberg vd., 2000). En az rastlanana da *kitinaz C*'dir. *kitinaz C* ise *kitinaz C1* ve *kitinaz C2* olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Bunların arasındaki fark ise C1 iki katalitik domain içerirken C2'nin bir adet katalitik domain içermesidir.

1.7. *Serratia marcescens*'in Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak Kullanılması

Kitinazların biyoteknolojik kullanımda ki en sık uygulanan alanı bitkisel patojenlere karşıdır. *S.marcescens* kültürlerindeki kitinazlar yaygın olarak biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır (Brurberg vd., 2000). Bu bakteri potansiyel böcek patojeni olarak kullanılmaktadır. Kitinaz ise bu bakterinin virülansında proteaz ve lektinaz ile birlikte çok önemli rol oynamaktadır (Uchiyama vd., 2003). Someya (2005), *S.marcescens* B2 suşunun

Rhizoctonia solani AG-1 IA patojenine karşı misel büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir. Inglis ve Lawrence (2001)'in yaptığı bir çalışmada laboratuvar ortamında *Heliothis virescens*'in F1 jenerasyonuna karşı *Serratia marcescens* etkisine bakılmıştır. Bunun sonucunda yumurta sayısında ve yumurtadan çıkan larva sayısında düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Lysyk (2002), *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) erginlerinin *Serratia marcescens* ile ölümlerinin sağlandığını gözlemlemiştir. Inglis (2000), doğal şartlar altında *Serratia marcescens*'in güneybatı mısır zararlısına karşı patojenik etkilerinin olduğunu tespit etmiştir. Yüksek kitinolitik aktiviteye sahip olan *Serratia marcescens* *in vitro* şartlarda *Botrytis* spp.'nin büyümesini baskılamaktadır. Sera alanında yapılan deneylerde ise *Serratia marcescens*'in siklamenin patojeni olan *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* ve *Fusarium oxysporum*'un kontrollerinde kullanılabileceği gösterilmiştir. *Serratia marcescens*'de bulunan kitinaz A ve kitinaz B genleri *Pseudomonas fluorescens* ve *E.coli* gibi diğer bakteriyal türlere aktararak biyokontrol ajanı olarak etkilerinin artırılma kabiliyetine bakılmıştır (Brurberg vd., 2000).

1.8. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada doğal olarak ölmüş olan *Helicoverpa armigera*'dan izole edilen *Serratia marcescens* bakterisinden elde edilen *chiA*, *chiB* ve *chiC* genleri tanımlanıp, ekspres edilerek elde edilen enzimlerin çalışma pH ve sıcaklık aralıkları belirlenmiştir. Kitinaz enzimlerinin biyolojik mücadele ve bitki hastalıkları için yaygın bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir. Enzimlerin endüstride çeşitli alanlarda da kullanıldığı göz önünde bulundurulduğunda bu enzimlerin de uygun şartlarda biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılması için geliştirilmesi hedeflenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bakteri İzolasyonu

Kültürü yapılan *Helicoverpa armigera* larvaları arasında doğal olarak ölmüş, vücudu sıvılaşmış ve kırmızı renk almış larvanın sıvılaşmış vücudundan öze yardımı ile alınan inokülüm Luria bertani (LB;1 litre LB için; 10 g Triptone, 5 g NaCl, 5 g Maya özü) agar ihtiva eden petriye çizgi ekim yöntemi ile inoküle edildi. İnokülasyonlar 30°C'ye ayarlanmış etüvde büyütüldü

İnkübasyon neticesinde petrilere tek tip ve beklenildiği üzere kırmızı renkli koloni üremesi gözlemlendi. Bu kolonilerin bir tanesinden taze LB besiyerisine tekrar ekim yapılarak saf ve tek bir koloniden üretilmiş bakteri kültürü elde edildi.

2.2. Bakteriyal İzolattan DNA İzolasyonu

Genomik DNA'nın izolasyonu, Sambrook ve arkadaşları (1989) tarafından açıklanan yöntemle yapıldı. Çalışmada kullanılan *Serratia marcescens* bakterisi, LB besiyerinde 30 °C'de bir gece inkübe edilerek üretildi. Elde edilen sıvı kültür iki kez oda sıcaklığında 13,000×g'de 3-4 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısmı dökülerek pellet kısımları saklandı. Pelletin üzerine, 500 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8) ilave edilerek pellet çözüldü. Daha sonra her bir tüpe 10 µg lizozim ilave edilerek vortekslendi ve 37°C'de 1 saat bekletildi. Hücrelerdeki proteinlerin parçalanması için, 50 µl %10'luk SDS eklenerek 37 °C'de 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda, tüpe 3 M'lık 0,1 hacim sodyum asetat (pH 5,2) eklendi ve 65 °C'de 10-30 dakika alt üst edilerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Üzerine 500 µl fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ilave edildi, tekrar alt-üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika 13000×g' de santrifüj edildi. Tüpün üst kısmındaki sıvı alınıp temiz tüpe bırakıldı, pellet kısmı ise atıldı. Bu tüpe tekrar 500 µl kloroform eklendi ve alt-üst edilerek 13000×g' de tekrar 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra, üzerlerindeki sıvı kısım alındı. Bu sıvı kısma 0,1 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim %96'luk etanol ilave edildi ve -20 °C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 13,000×g'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvı boşaltıldı. Kalan pelletin

üzerine 500 µl %70'lik etanol ilave edilerek tekrar 13,000×g'de 2 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki sıvı dökülerek pellet açık havada kurutuldu. Elde edilen DNA pelleti, 100 µl ddH₂O'da çözüldü ve -20 °C'de muhafaza edildi.

2.3. 16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Çoğaltılması

16S rRNA geni, *Serratia marcescens* genomik DNA'dan UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') ileri ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3') geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonlarının şartları Beffa (1996)'ya göre oluşturuldu. 12 ng kalıp DNA, 5 ul 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, IU Taq DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM d ATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril saf su ile 50µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200µl'lik tüplerde, "Biometra Personal Cycler"da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denatürasyon basamağı 95°C'de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü 94°C'de 1 dakika (denatürasyon için), 56°C'de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72°C'de 2 dakika (polimerizasyon için) şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürününün 5µl'si % 1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5µg/ml) ile boyandıktan sonra "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntülendi.

2.4. 16S rRNA Geninin Baz Dizisinin Belirlenmesi ve Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması

Yukarıda açıklanan primerler kullanılarak genomik DNA'dan çoğaltılan 16S rRNA geni klonlama vektörü olan pGEM-T-Easy vektörüne klondandı. Klondandığı teyit edilen kolonilerden bir tanesinin baz dizin analizi Macrogen firması (Korea) tarafından gerçekleştirildi. Elde edilen yaklaşık 1400 bp uzunluğundaki 16S rRNA dizisi Gen Bankasında var olan dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı.

2.5. Kitin Testi

Elimizdeki bakteriyal izolata ait 16S rRNA geninin dizin analizi neticesinde, bu bakterinin *Serratia marcescens* olduğu belirlendi. Literatürde *S. marcescens* bakterileri arasında kitinaz enzimi üretimi yaygın olduğu için, bizde elimizde ki bu izolatın kitinaz üretme kabiliyetini genel bir kitin tarama testi ile araştırmayı hedefledik.

Bu hedef doğrultusunda bakteri LB besiyeri içerisinde 16 saat büyütüldü. Büyütülen bakterinin 3 ml'si 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 3 ml steril PBS tamponunda iki kez yıkandı. Daha sonra yoğunluğu OD₆₀₀ de 0,1 olacak şekilde ayarlandı

2.6. Koloidal Kitinin Hazırlanması

Kolloidal kitinin hazırlanması Roberts ve Selitrennikoff (1986) tarafından belirtilen prosedüre göre yapıldı. 5 gram toz kitin alınarak üzerine 100 ml konsantre HCl eklendi ve bir gece boyunca yüksek hızda +4°C'de karıştırıldı. Elde edilen karışımın üzerine 2 litre etanol eklenerek yine yüksek hızda iki gün boyunca karıştırıldı. Elde edilen bu kolloid kitin toplanarak 15000g de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilecek pellet saf su ile yıkandı ve bu işlem birkaç kez tekrarlandı. En son elde edilen kitin pastası 1/100 oranında saf su ile sulandırıldı otoklavlanıp ve sonraki kullanımlar için +4°C'de depolandı.

2.7. Agar Difüzyon Metodu

Bakteriyal izolat konvansiyonel kitinli M9 minimal agar (substrat kolloidal kitin) yöntemi ile kitinaz taramasına tabi tutuldu (Sambrook et al. 1989). Bu besiyerinde karbon ve enerji kaynağı olarak sadece kitin vardır. Bu agarın üzerine yerleştirilen külsüz whatman kağıt disklerle bakteriyal izolat inokule edildi. Daha sonra disk taze kültürle uygun oranda inokule edildi. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Daha sonra bu petri 30 °C'de inkübe edildi ve koloninin etrafındaki görülecek şeffaf zon pozitiflik olarak kaydedildi.

2.8. *kitinaz* Genlerinin PCR Aracılığıyla Belirlenmesi

Literatürde *S. marcescens* bakterilerinin 3 farklı *kitinaz* geni ihtiva edebilecekleri bildirilmektedir. Biz de elimizdeki *S. marcescens* izolatının bu üç farklı *kitinaz* genlerinden hangisini veya hangilerini ihtiva ettiğini belirleyebilmek için bu üç *kitinaz* genlerine ait dejenerat primerler hazırladık (Tablo 3). Bunun için gen banksında mevcut olan ve *S. marcescens* bakterilerine ait olan *kitinaz* A, B ve C genlerine ait nükleotid sıraları toplandı. Bu sıralar Clustal W Multiple Sequence Alignment programı yardımıyla alt alta dizilerek karşılaştırıldılar. Genlerin başlangıç ve bitiş kısımlarına denk gelecek şekilde dejenerat primerler dizayn edildi. Elimizdeki *S.marcescens*'in *kitinaz* içeriğini bu primerleri kullanarak araştırdık.

Tablo 3. *kitinaz* genlerine ait primer dizileri

Primer	Sıra (5'-3')
<i>kitinaz A</i> Fw	5'- GG <u>CATATG</u> CGCAAATTTAATAAACCGYTG -3' <i>NdeI</i>
<i>kitinaz A</i> Rv	5'CCG <u>GATCCT</u> CAYTAWKGHRYRCCGRCGCTRTTGCCC-3' <i>BamHI</i>
<i>kitinazB</i> Fw	5'- GG <u>CATATG</u> TCCRMACGYAAAGCSGTTATTGG -3' <i>NdeI</i>
<i>kitinazB</i> Rv	5'- CCA <u>AAGCTT</u> TTCATTAYGCYASRCGGCCCACYTTCAGCC -3' <i>HindIII</i>
<i>kitinazC</i> Fw	5'- GG <u>CATATG</u> AGCACAAATAACAYTATTAATGC-3' <i>NdeI</i>
<i>kitinazC</i> Rv	5'CCG <u>GATCCT</u> CATTAGGCGATGAGCTGCCACAGGGTG-3' <i>BamHI</i>

2.8.1. *kitinaz* Genlerinin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması

kitinaz genlerine ait yukarıdaki primerler kullanılarak PCR reaksiyonları yapıldı.. Reaksiyonlar 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Her bir tüpe 2,5 ünite Go Taq DNA polimeraz (Promega), 5 µl 5x PCR tamponu(10mM Tris-HCl, pH 8,3), 3 µl 2,5 mM MgCl₂, 1,5 µl 1mM ileri primeri, 1,5 µl 1mM geri primeri, 1 µl 10 mM dNTP'den ve 2 µl genomik DNA bırakılarak steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı.

PCR şartları 94 °C'de 3 dakikalık denatürasyondan sonra 10 döngü olacak şekilde 94 °C'de 1 dakika, 48 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika sonra 25 döngü olacak şekilde 94 °C'de 1 dakika, 50 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika ve son olarak da 72 °C'de 7 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi.

2.9. *kitinaz* A, B ve C Genlerinin PGEMT-Easy Vektöre Klonlanmaları

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan *kitinaz* A, B ve C genleri agaroz jelden kesilerek Nucleospin Extract DNA Purification (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendi. Jelden temizlenen DNA fragmentleri, pGEM-T Easy vektöre (Promega) 3 DNA fragmenti 1 vektör oranında (0,3 µg DNA fragmenti ve 0,1 µg PGEMT-Easy) klonlandı. Reaksiyonlar her bir gen için, 1µl pGEMT-Easy vektörü, 7,5 µl 2x ligasyon tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz ve 5,5 µl DNA fragmenti bir araya getirilerek 15 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi. Karışım 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldılar.

2.10. *kitinaz* A, B ve C Genlerinin Elektrokompotent *E.coli* DH10β'ya Aktarımı

Petriye ekilmiş *E.coli* DH10β hücrelerinden tek bir koloni alınıp NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37 °C'de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden fazla miktarda LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37 °C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,6-0,9 olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşınca, hücreler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4 °C'de 4.000×rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti iki kez soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve zamanda santrifüj edildi. Çökelti %10'luk soğuk

gliserolde çözüldü ve $5.000 \times rpm$ 'de $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti az miktarda %10'luk gliserol içinde süspansiyon haline getirildi. Elde edilen kompotent hücreler mikrosantrifüj tüplerine bölündü ($50 \text{ }\mu\text{l}$ 'lik hacimlerde) ve $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Yukarıdaki işleme göre hazırlanan elektrokompotent *E.coli* DH10 β hücrelerinden 2 tüp alınarak buza yerleştirildi. Tüplerin birine $3 \text{ }\mu\text{l}$ ligasyon ürünü bırakılırken, diğerine hiçbir şey eklenmeyerek kontrol olarak kullanıldı. Tüpler iyice karıştırıldı ve tekrar 1 dakika buzda bekletildi. Tüplerdeki karışımlar, elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı ve elektroporasyon cihazı (BioRad Micro Pulser)'nın elektriksel tetik kısmına yerleştirilerek elektrik uygulandı. Kuvvetler cihazdan alınarak içlerine 1 ml LB besiyeri eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra tüm karışım steril bir cam tüpe bırakılarak $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'de 200 rpm 'de 1 saat boyunca büyümeye bırakıldı. İnkübasyondan sonra büyüyen kültürler ependorf tüplere aktararak 6000 g 'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Ependorfta $100 \text{ }\mu\text{l}$ kalacak şekilde süpernatant döküldü ve kalan süpernatant içinde pellet çözüldükten sonra $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ampisilin içeren LB agar petrilere (üzerine 100mg/ml IPTG çözeltilisinden $40 \text{ }\mu\text{l}$ ve 20 mg/ml X-gal çözeltilisinden $40 \text{ }\mu\text{l}$ sürülmüş petrilere) yayıldı. Gece boyunca $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda içerisinde plazmid alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçildi.

2.11. Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi

Mavi/ beyaz koloni morfolojisine göre ayırım yapılarak seçilen beyaz kolonilerden içerdikleri plazmid DNA'larını izole etmek için $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ampisilin içeren LB besiyerine ekim yapıldı ve $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'de 200 rpm 'de gece boyu inkübe edildi. Plazmit DNA'larının izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri $14.000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant geride $50 \text{ }\mu\text{l}$ kalacak şekilde döküldü ve çökelti bunun içinde vortekslenerek çözüldü. Üzerine $300 \text{ }\mu\text{l}$ TENS tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8.0, $0,1 \text{ mM}$ EDTA, $0,1 \text{ N}$ NaOH, % 0,5 SDS) ilave edilerek karıştırıldı. Bunu takiben üzerine $150 \text{ }\mu\text{l}$ 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi ve tekrar 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı. $14.000 \times g$ 'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine $900 \text{ }\mu\text{l}$ %100'lük etanol ilave edilerek $14.000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Çökelti %70'lik etanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti $50 \text{ }\mu\text{l}$ ddH₂O'da çözüldü. İzole edilen plazmit DNA'ların DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için bu plazmit

DNA'ları *kitinaz A* için *NdeI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri, *kitinaz B* için *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ve *kitinaz C* için *NdeI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. *kitinaz A* için 10 µl DNA, 0,5 µl *NdeI* (promega), 0,5 µl *BamHI* (promega), 2 µl enzime ait 10× reaksiyon tamponu ve 7 µl H₂O, *kitinaz B* için 10 µl DNA, 0,5 µl *NdeI* (promega), 0,5 µl *HindIII* (promega), 2 µl enzime ait 10× reaksiyon tamponu ve 7 µl H₂O ve *kitinaz C* için 10 µl DNA, 0,5 µl *NdeI* (promega), 0,5 µl *BamHI* (promega), 2 µl enzime ait 10× reaksiyon tamponu ve 7 µl H₂O olacak şekilde 20 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından %1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

2.12. Klonların İçerdiği DNA Parçalarının Dizi Analizi

Elde edilen klonlardan seçilen 3 tanesinin 5 ml ampisilinli LB besiyerine ekimi yapıldı ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyu inkübe edildi. 14-16 saatlik büyüme sonucu elde edilen kültürler, 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega, USA) kiti kullanılarak izole edildi. Plazmid DNA konsantrasyonları OD₂₆₀'da belirlendi. Tüm DNA'lardan 20 µl'lik hacim içinde 200 ng/µl konsantrasyonlarında hazırlandı. Üzerleri dikkatli bir şekilde etiketlenerek MacroGen Firmasına (Güney Kore) DNA bazlarının otomatik analiz edilmesi için gönderildi.

2.13. Elde Edilen DNA Baz Dizilimlerinin İncelenmesi

Sekans sonucunda elde edilen *kitinaz A*, *kitinaz B* ve *kitinaz C* genlerinin baz ve aminoasit dizilimi gen bankasında bulunan diğer *kitinaz A*, *kitinaz B* ve *kitinaz C* genleri ile Clustal W Multiple Sequence Alignment programı vasıtasıyla karşılaştırıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

2.14. *kitinaz A*, *kitinaz B* ve *kitinaz C* Genlerinin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanmaları

Ekspresyon vektörü olan pET-28a(+)’yı içeren *E.coli* BL21 bakterisine ait bir koloniden 50 µg/ml kanamisin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyu büyütüldü. 14-16 saatlik büyüme sonucu elde edilen kültür 14.000 rpm'de 2

dakika boyunca çöktürüldükten sonra plazmid DNA izolasyonu, “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega, USA) kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

2.14.1. pET-28a(+) Ekspresyon Vektörünün *NdeI*, *BamHI* ve *NdeI*, *HindIII* Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

İzole edilen plazmid DNA’sından iki tüpe 500’er ng bırakılarak *NdeI* ve *BamHI* enzimleri ile kesildi. Reaksiyonlar, 10’ar µl plazmid DNA 3’er µl 10X TA tamponu, bir tüp için 1,5 µl *NdeI*, 1,5 µl *BamHI*, diğer tüp için 1,5 µl *NdeI*, 1,5 µl *HindIII* ve 14’er µl steril ddH₂O bir araya getirilerek son hacim 30 µl olacak şekilde hazırlandı ve 37 °C’de 3 saat boyunca inkübe edildi. İnkübe edilen ürün %1’lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Restriksiyon endonükleazlarla lineer hale gelmiş ve 5369 bp büyüklüğündeki iki farklı kesim pET-28a(+) vektörleri, DNA temizleme (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendiler.

2.14.2. *kitinaz* Genlerinin pGEMT-Easy Klonlama Vektöründen Kesilerek Çıkarılmaları

kitinaz genlerini pGEMT-Easy vektörüne klonlanmış durumda içeren *E.coli* DH10β bakterilerine ait birer koloniden 50 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C’de 200 rpm’de gece boyunca büyütüldü. Elde edilen kültürler, 14.000 rpm’de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra plazmid DNA izolasyonu kiti (Promega, USA) kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen rekombinant plazmid DNA’dan 200 ng alınarak, 3 µl 10X TA tamponu, 1’er µl *kitinaz* A ve C için *NdeI* ve *BamHI*, *kitinaz* B için ise *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri bir araya getirilerek toplam 30 µl son hacimde reaksiyon hazırlandı ve bu reaksiyon 37 °C’de 3 saat boyunca inkübe edildi. Kesim ürünleri DNA standardı olarak 1kb DNA Ladder (Promega) ile birlikte %1’lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. pGEMT-Easy vektöründen *NdeI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek ayrılmış *kitinaz* A ve *kitinaz* C ile *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek ayrılmış *kitinaz* B genleri, agaroz jelden kesilerek alındılar ve DNA temizleme kiti kullanılarak temizlendiler.

2.14.3. *kitinaz* A, B ve C Genlerinin pET-28a(+) Vektörüne Aktarımı

Jelden temizlenen *kitinaz* A, B ve C genleri ve pET-28a(+) vektörü 3 vektör ve 1 DNA olacak şekilde birbirlerine yapıştırıldılar. Buna göre her bir gen için reaksiyon; 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu (Promega), 1 µl T4 DNA ligaz enzimi (Promega), 2 µl pET-28a(+) vektörü, 6 µl insert DNA ve 9 µl ddH₂O olacak şekilde hazırlandı ve reaksiyon 16 °C’de gece boyu bekletildi.

2.15. pET-28a(+)’ya Klonlanan *kitinaz* A, B ve C Genlerinin *E.coli* BL21(DE3) Hücrelerine Aktarımı

Rekombinant plazmit *E.coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarılmadan önce *E.coli* DH10β elektrokompotent hücrelerine aktarıldı. Restriksiyon endonükleazlar ile kesim yapılarak genin varlığı doğrulandı. Daha sonra kullanılacak olan *E.coli* BL21(DE3) hücrelerine ait bir koloni 3 ml LB besiyerine aşılandı ve elde edilen kültür 37 °C’de 200 rpm’de gece boyunca inkübe edildi. Bu kültürden, CaCl₂’lü metoda göre kompetent hale getirilmiş *E.coli* BL21(DE3) hücreleri elde edildi. Kompetent hücrelere DNA aktarımı için rekombinant plazmit DNA’sından 3 µl alındı ve 200 µl hücre eklendi. Karışım 30 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra 2 dakika 45 °C’de bekletildi. Daha sonra reaksiyon karışımı, içerisinde 1 ml LB besiyeri olan cam tüpe bırakıldı ve 37 °C’de 2 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda ependorf tüpe alınan kültür 6000×g’de 3 dakika santrifüj edildi. Pellet halindeki hücrelerin üzerinde 100 µl besiyeri kalacak şekilde fazla besiyeri döküldü. Daha sonra 50 µg/ml kanamisin içeren LB agar petrilere yayıldı ve gece boyunca 37°C’de inkübe edildi. Aynı yöntemle pET-28a(+) vektörünün kendisi de *E.coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarıldı.

2.16. *Kitinaz* A, B ve C Proteinleri, Ekspresyonu ve İzolasyonu

İlgili proteini ekspres etmek için *kitinaz* genlerini ihtiva eden rekombinant pET-28a(+) vektörleri, *E.coli* BL21(DE3) konak hücrelerine aktarıldı. Aktarım sonucu oluşan kolonilerden 1’er tanesi 50 µg/ml kanamisin içeren 3 ml LB besiyerine kürdan yardımıyla bırakıldı. Bu tüp 200 rpm’de 37 °C’de bir gece boyunca inkübe edildi. Elde edilen gece kültürü, 100 ml kanamisinli besiyerine eklendi. OD₆₀₀=0,5-1 olduğunda gen ekspresyonunu indüklemek için 100 µl IPTG (Stok konsantrasyonu 240mg/ml) besiyerine ilave edilerek tekrar büyümeye

birakıldı. Yaklaşık 4 saat sonra kültür alınarak 50 ml'lik propilen (Nalgene, Sigma-Aldrich) tüplere aktarıldı. 4° C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 12 ml 20 mM Tris-Cl pH=7,5'da çözüldü ve tekrar aynı şekilde santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek pelletin üzerine 5 ml 20 mM Tris-Cl pH=7,5 tamponu eklenerek hücreler karıştırıldı. Daha sonra 50 µl lizozim (10mg/ml) eklenerek 30°C'de 15 dakika inkübe edildi ve bu süre sonunda hücreler 1 dakika boyunca sonikatörde parçalandı. Son olarak, 4° C'de 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Kalan pellet 2 ml 20 mM Tris-Cl pH=7,5 tamponunda çözüldü ve -80 ° C'de muhafaza edildi. *E.coli* BL21(DE3)'e aktarılan pET-28a(+) ve *E.coli* BL21(DE3)'in kendisinden de aynı yöntemle protein izolasyonu gerçekleştirildi.

2.17. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarının tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler ddH₂O ile 250 µl' ye tamamlandı. Ardından üzerine 250'şer µl hazır boya çözeltisinden (Protein Reagent, Sigma) ilave edildi ve vortekslendi. Hazırlanan standart ve örnekler 96 gözlü mikropate üzerine aktarıldı ve UV-visible Spektroskopi System cihazı (Bio-rad) kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı.

2.18. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein ekspresyonunun gözlenmesi amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı. SDS poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile her bir örnekten 80 µg protein kullanılarak yürütüldü. Her bir örnek üzerine muamele tamponu (60mM Tris-HCl (pH 6,8), %25 Gliserol, %2 SDS, %5 β-merkaptoetanol, %0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra numuneler kaynayan su içerisinde 10 dakika bekletildi. Daha sonra Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %10'luk SDS-PAGE'e yüklendi. Jele 30 mA akım uygulanarak ayrılma işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue (%0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı ve

hemen ardından yıkama çözeltilisinde (%36 Metanol, %9 Asetik Asit) 1-2 saat yıkandı. Jel görüntüsü tarayıcı ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

2.19. Proteinin Saflaştırılması

pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlama yapılırken histidin kuyruk kesilmeden kalacak şekilde yapıldı. Bu özellikten faydalanarak MagneHis Protein Purification System (Promega) kiti kullanılarak saflaştırma yapıldı.

2.20. Deneylerde Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi

Deneylerde kullanılacak enzim miktarını belirlemek için substrat (koloidal kitin) miktarı sabit tutularak 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl, 60 µl enzim miktarlarıyla reaksiyonlar gerçekleştirildi. Reaksiyon 50 mM Tris (pH 7,4) tamponunda 100 mM kitinaz varlığında 33°C'de 30 dk süre ile gerçekleştirildi. Reaksiyonlar sonucunda karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak enzim miktarı belirlendi.

2.21. Enzimlerin Çalıştığı Optimum pH'ların Belirlenmesi

Serratia marcescens'e ait kitinaz genlerinin en iyi çalıştığı pH'yı bulmak için, pH'sı 4,0–6,0 olan 50 mM asetat tamponu; pH'sı 6,0–8,0 olan 50 mM fosfat tamponu; pH'sı 7,5–9,0 olan 50 mM Tris tamponu; pH'sı 9,0–12,0 olan 50 mM glisin tamponları kullanılarak aktivite deneyleri gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 75 µl enzim kullanılarak 25 mM kitinaz varlığında 500 µl son hacimde ve 33°C'de 30 dk boyunca gerçekleştirildi. Daha sonra 500 µl DNS eklenerek 10 dk boyunca kaynatıldı. Kaynatılan örnekler 560 nm'de ölçüldü. Gözlenen optimum pH daha sonraki deney şartlarında kullanılacak olan reaksiyon pH'sı olarak belirlendi.

2.22. Enzimlerin Çalıştığı Optimum Sıcaklık'ların Belirlenmesi

Kitinaz B'nin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri, (1 mM Glisin pH 9) tamponu içerisinde 0,502 µg enzim kullanılarak 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60°C'lerde Eppendorf Termomixer

cihazında gerçekleştirilen aktivite deneyleriyle bulundu. Kitinaz C'nin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri, (1 mM Glisin pH 8,5) tamponu içerisinde 0,502 µg enzim kullanılarak 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60°C'lerde Eppendorf Termomixer cihazında gerçekleştirilen aktivite deneyleriyle bulundu. İlk olarak 30 - 35°C aralığı belirlendi. Daha sonra sıcaklık noktasını daha hassas bir biçimde belirlemek için 31, 32, 33, 34°C'lerde deney tekrarlanarak optimum reaksiyon sıcaklığı belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. *Helicoverpa armigera*'dan Elde Edilen Bakterinin 16S rRNA Baz Dizisinin Belirlenmesi

PCR yardımıyla çoğaltılan genin 16S rRNA sekans analizi (Ek 1) yapıldı ve %99 oranında *Serratia marcescens* bakterisine benzerlik gösterdiği tespit edildi. İzolatımız *Serratia marcescens* Ha olarak kodlandı.

3.2. *Serratia marcescens* Ha İzolatına Ait Agar Difüzyon Metodu İle Genel Kitinaz Taraması

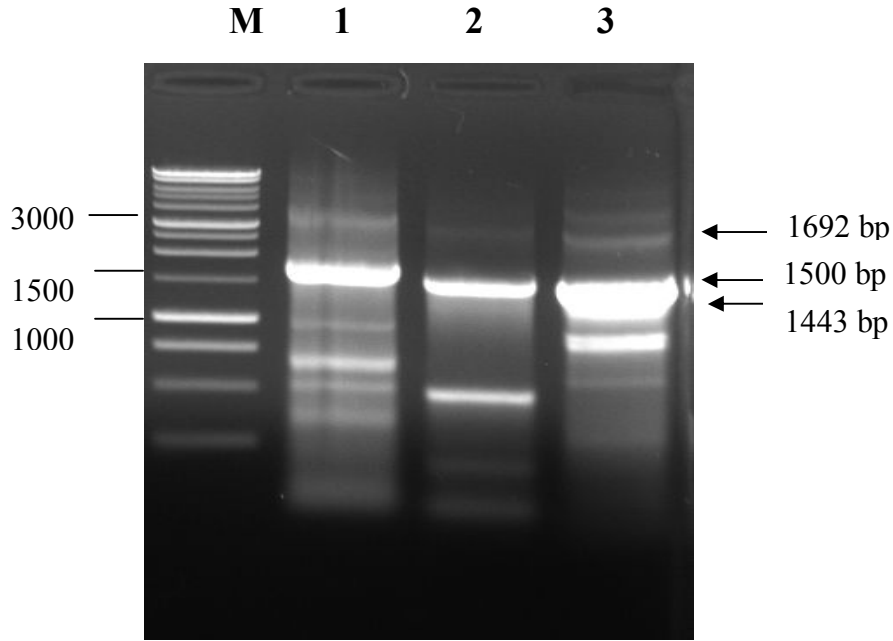
Bakterinin agar difüzyon metodu ile yapılan ekimi sonucu zon gözlemlendi (Şekil 4). Bu sonuca göre bu bakterinin kitinaz pozitif olduğu belirlendi.



Şekil4. *Serratia marcescens* bakterisine ait agar difüzyon sonucu

3.3. *kitinaz* Genlerinin PCR Aracılığıyla Belirlenmesi

kitinaz A, *kitinaz B* ve *kitinaz C* genleri dizayn edilen uygun primerler (Tablo 3) ile PCR'da çoğaltıldı. PCR ürünleri agaroz jelde elektroforez yapıldı. Sonuçta *kitinaz A* geninin 1692bp, *kitinaz B* geninin 1500 bp, *kitinaz C* geninin ise 1443 bp büyüklüğünde bantlar oluşturduğu belirlendi (Şekil 5).



Şekil 5. PCR ile çoğaltılmış *kitinaz A*, *kitinaz B* ve *kitinaz C* genlerinin agaroz jel görüntüsü. M: 1 kb DNA ladder (Promega), 1: *kitinaz A* geni, 2: *kitinaz B* geni, *kitinaz C* geni

3.4. *Serratia marcescens* Bakterisinin *kitinaz A*, *B* ve *C* Genlerinin Klonlanması ve Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi

kitinaz A, *kitinaz B* ve *kitinaz C* genleri PCR ile çoğaltıldıktan sonra pGEMT-Easy klonlama vektörüne aktarıldı. Nükleotid sırasının belirlenmesi için dizin analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Dizin analizi işlemi genlerin her iki tarafından gerçekleştirildi. Analiz sonucuna göre, *kitinaz A* için toplam 1692 nükleotid uzunluğunda bir sıra elde edildi. Genin tamamı 1692 bp olduğundan dolayı aradaki eksik olan bölgenin belirlenmesi için okunmuş sıralardan yararlanarak yeni bir primer (*ChiA* ara bol Fw; (5'-GCGGCGGCAACGGCATCAACG-3') dizayn edildi. Ara bölgenin DNA diziliminin belirlenmesi için dizin analizine tekrar gönderildi. Böylece ara bölgenin de sırası belirlenerek DNA dizin analizi tam olarak gerçekleştirildi (Ek 2). *kitinaz B* için 1500 nükleotid uzunluğunda bir sıra elde edildi (Ek 3). *kitinaz C* için ise 1443 nükleotid uzunluğunda bir sıra elde edildi (Ek 4).

DNA dizin analizi gerçekleştirilen genlerin aminoasid sıraları da belirlendi (Ek 5, 6, 7). Bu sıralar *kitinaz A* için 563 aa, *kitinaz B* için 499 aa ve *kitinaz C* için 480 aa olarak tespit edildi.

3.5. *Serratia marcescens* Bakterisinin *kitinaz A, B ve C Genlerinin Nükleotid Sıralarının Literatür ile Karşılaştırılması*

Elde edilen mevcut nükleotid sıraları NCBI web adresindeki Blast programı kullanılarak gen bankasındaki mevcut *kitinaz* sıraları ile karşılaştırmaları yapıldı. Karşılaştırma sonucuna göre, elimizdeki izolatın *kitinaz A* geni, gen bankasında ki *S.marcescens* (BJL200) *chiA* genine %99, *Serratia marcescens* Bn10 endochitinase (*chiA*) genine %98, *Serratia marcescens* C8-8 suşuna ait (*chiA*) genine %97, *Serratia marcescens* ATCC 990 (*chiA*) genine %96 oranında benzerlik göstermektedir (Tablo 4). İzolatımıza ait *kitinaz B*, literatürde ki *S.marcescens* (BJL200) *chiB* genine %97, *Serratia marcescens chiB* genine %95, *Serratia marcescens chiB* genine %95 ve *Serratia marcescens (chiB)* genine %91 oranında benzerlik göstermektedir (Tablo 5). İzolatımıza ait *kitinaz C* ise, literatürde ki *Serratia marcescens chiC1* genine %98, *Serratia marcescens (chiC)* genine %96, *Serratia marcescens chiC* genine %96 ve *Serratia marcescens* 141 suşuna ait (*chiC*) genine %95 oranında benzerlik göstermektedir (Tablo 6).

Tablo 4. *Helicoverpa armigera* orijinli *S. marcescens*'e ait *kitinaz A* genine ait nükleotid sıralarının literatürde ki sıralar ile karşılaştırma sonuçları

Accession numarası	Adı	Büyüklüğü	Benzerlik
Z36294.1	<i>S.marcescens</i> (BJL200) <i>chiA</i>	1698bp	%99
DQ165083.1	<i>Serratia marcescens</i> Bn10 (<i>chiA</i>)	1692bp	%98
EU753246.1	<i>Serratia marcescens</i> C8-8 suşuna ait (<i>chiA</i>)	1692bp	%97
AY855211.1	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 990 (<i>chiA</i>)	1692bp	%96

Tablo 5. *Helicoverpa armigera* orijinli *S. marcescens*'e ait *kitinaz B* genine ait nükleotid sıralarının literatürde ki sıralar ile karşılaştırma sonuçları

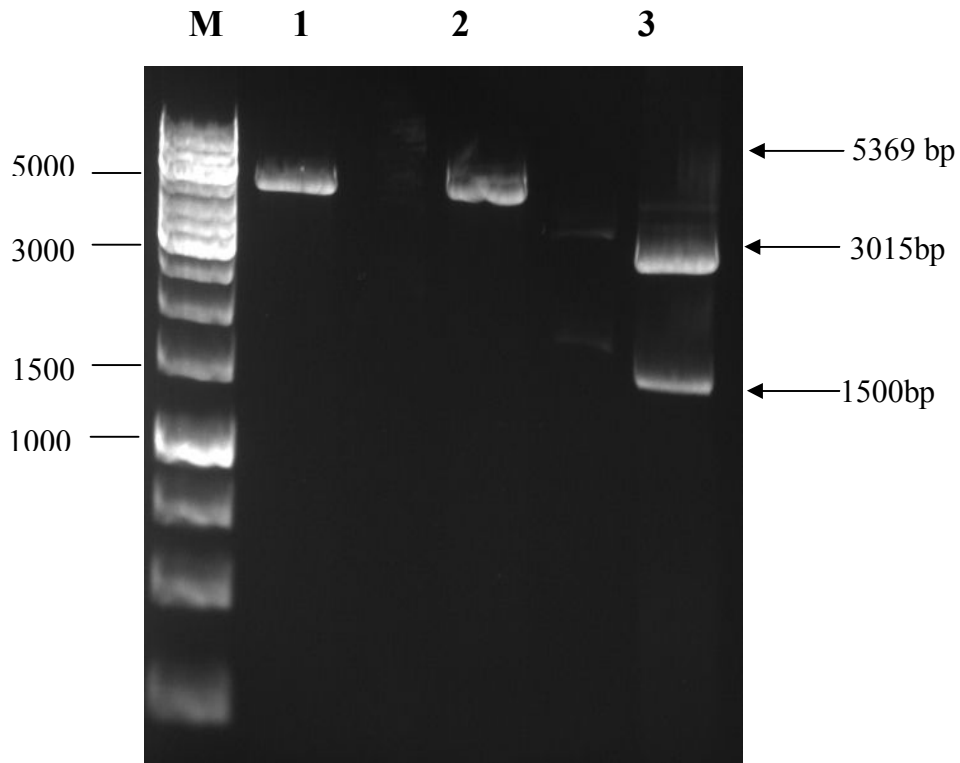
Accession numarası	Adı	Büyüklüğü	Benzerlik
Z36295.1	<i>S.marcescens</i> (BJL200) <i>chiB</i>	1836bp	%97
AB015997.1	<i>Serratia marcescens chi B,</i>	1730bp	%95
X15208.1	<i>Serratia marcescens chiB</i>	1700bp	%95
DQ868535.1	<i>Serratia marcescens (chiB)</i>	1690bp	%91

Tablo 6. *Helicoverpa armigera* orijinli *S. marcescens*'e ait *kitinaz C* genine ait nükleotid sıralarının literatürde ki sıralar ile karşılaştırma sonuçları

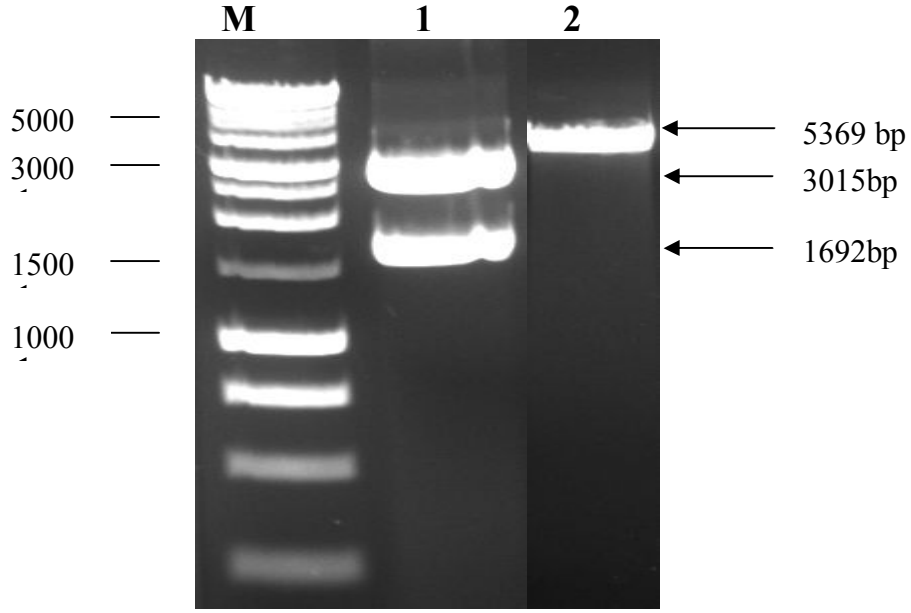
Accession numarası	Adı	Büyüklüğü	Benzerlik
AJ630582.1	<i>Serratia marcescens chiC1</i>	1862bp	%98
AF454464.1	<i>Serratia marcescens (chiC)</i>	1443bp	%96
AB019238.1	<i>Serratia marcescens chiC</i>	1740bp	%96
DQ990374.1	<i>Serratia marcescens</i> 141 suşuna ait (<i>chiC</i>)	1461bp	%95

3.6. *kitinaz* A, B ve C Genlerinin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

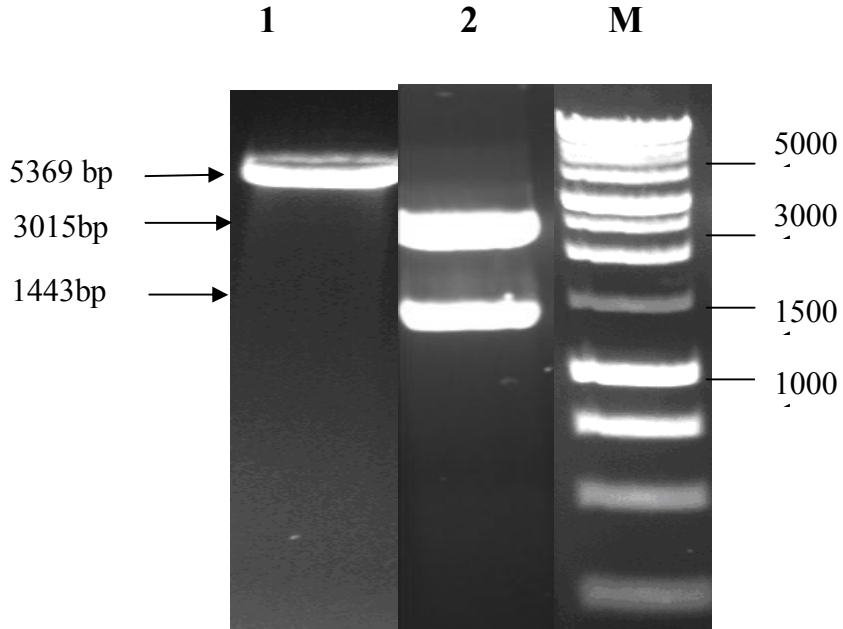
Sekansı elde edilen klonların birer tanesinden kit kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapıldı. pGEMT-Easy vektörüne klonlanmış *kitinaz* A, B ve C genleri ekspresyon vektörüne aktarılmak üzere *kitinaz* A için *Nde*I ve *Bam*HI, *kitinaz* B için *Nde*I ve *Hind*III ve *kitinaz* C için *Nde*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile kesildi ve agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu (Şekil 6, 7, 8). Bu arada pET-28a(+) ekspresyon vektörü de aynı enzimler ile kesildi. Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş vektör ve *kitinaz* genleri birbirine yapııştırıldı.



Şekil 6. *Nde*I ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesilen pET-28a(+) ve *chi*B'nin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: 1kb DNA Ladder, 1: pET-28a(+)'nın *Nde*I ve *Hind*III kesim sonucu, 2: pET-28a(+)'nın *Hind*III ve *Nde*I kesim sonucu, 3: *chi*B'nin *Hind*III ve *Nde*I)



Şekil 7. *Nde*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile kesilen pET-28a(+) ve *chiA*'nin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: 1kb DNA Ladder, 1: *chiA*'nin *Bam*HI ve *Nde*I, 2: pET-28a(+)’nın *Nde*I ve *Bam*HI kesim sonucu)

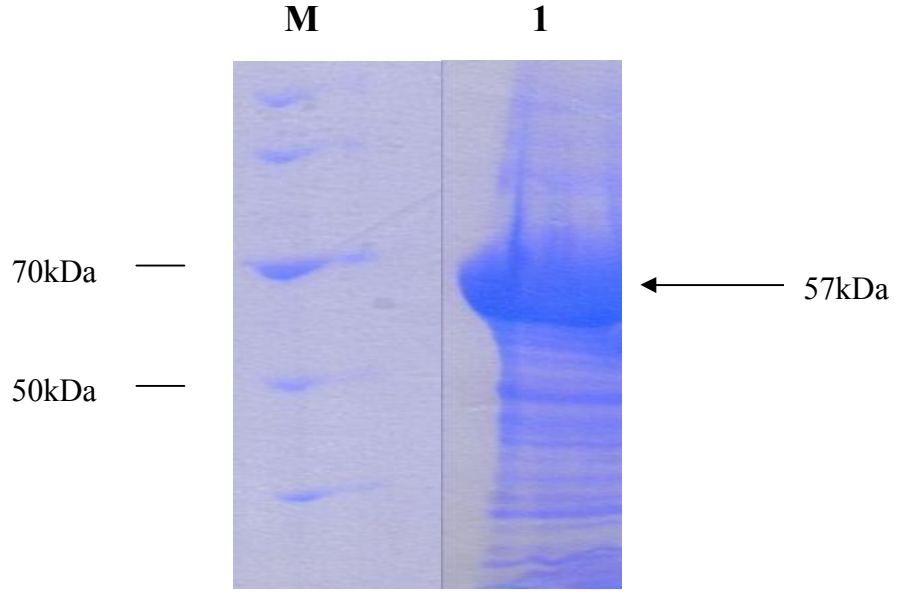


Şekil 8. *Nde*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile kesilen pET-28a(+) ve *chiC*'nin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü (1: pET-28a(+)’nın *Nde*I ve *Bam*HI kesim sonucu, 2: *chiC*'nin *Bam*HI ve *Nde*I, M: 1kb DNA Ladder)

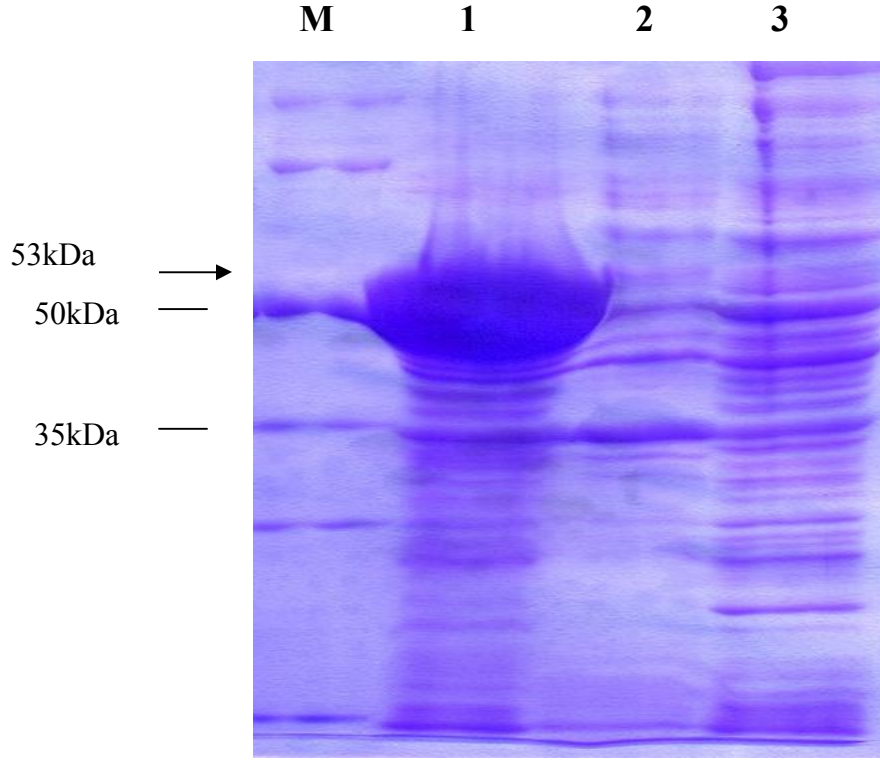
kitinaz genlerini yapıştırdığımız pET-28a(+) plazmidi elektrokompetent *E.coli* DH10 β konak hücresine aktarıldı. Elde edilen kolonilerden plazmid DNA'lar izole edildi. Bu plazmidlerin *kitinaz* genlerini içerip içermediği, *kitinaz* A ve C için *NdeI* ve *BamHI*, *kitinaz* B için ise *NdeI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilerek bakıldı. *kitinaz* genlerini içeren plazmidler seçildi ve sonraki çalışmalarda kullanıldı.

3.7. Protein Ekspresyonu ve SDS-PAGE Analizi

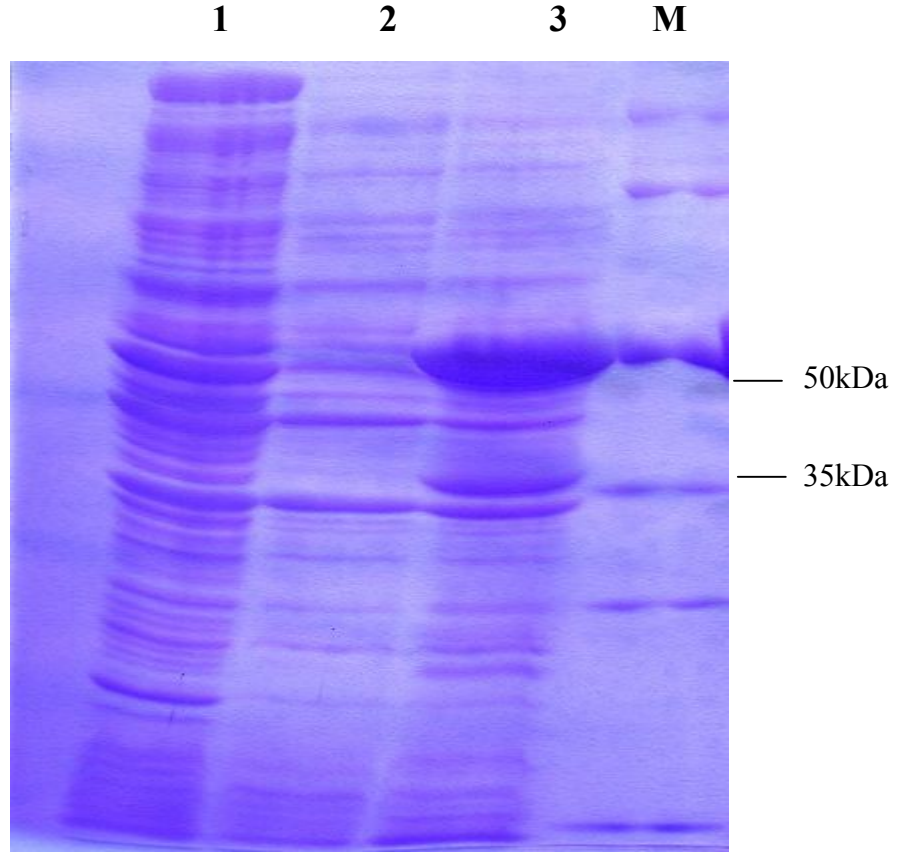
Protein ekspresyonu için *kitinaz* genlerinin klonlandığı pET-28a(+) vektörü, *E.coli* BL21(DE3) konak hücresine aktarıldı. Ayrıca kontrol olarak kullanılmak üzere *kitinaz* genlerini içermeyen pET-28a(+) vektörü de *E.coli* BL21(DE3) hücresine aktarıldı. *kitinaz* genlerini klonladığımız pET-28a(+) vektörünün transform edildiği *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinden, sadece pET-28a(+)'nın transfer edildiği *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinden ve içerisinde plazmid bulunmayan *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinden protein ekspreslenerek SDS-PAGE'de kullanılmak üzere izole edildi. Protein ekspresyonu 1mM IPTG ile indüklenerek yapıldı ve ekspresyon 4 saat süreyle gerçekleştirildi. Hazırlanan proteinler %10'luk SDS-PAGE'de analiz edildi. SDS-PAGE analizi sonucunda, *E.coli* BL21 (DE3) hücresinde ekspreslenmiş olan *kitinaz* A için 57 kDa'luk, *kitinaz* B için 53 kDa'luk ve *kitinaz* C için ise 50 kDa'luk protein bantları tespit edildi (Şekil 9, 10, 11).



Şekil 9. *E.coli* BL21(DE3)'de üretilen *kitinaz* A genine ait SDS-PAGE analizi. (M: Protein markırı (Bio-Rad), 1: *E.coli* BL21(DE3)'de IPTG ile indüklenmiş pET-28a(+)-*chiA*)



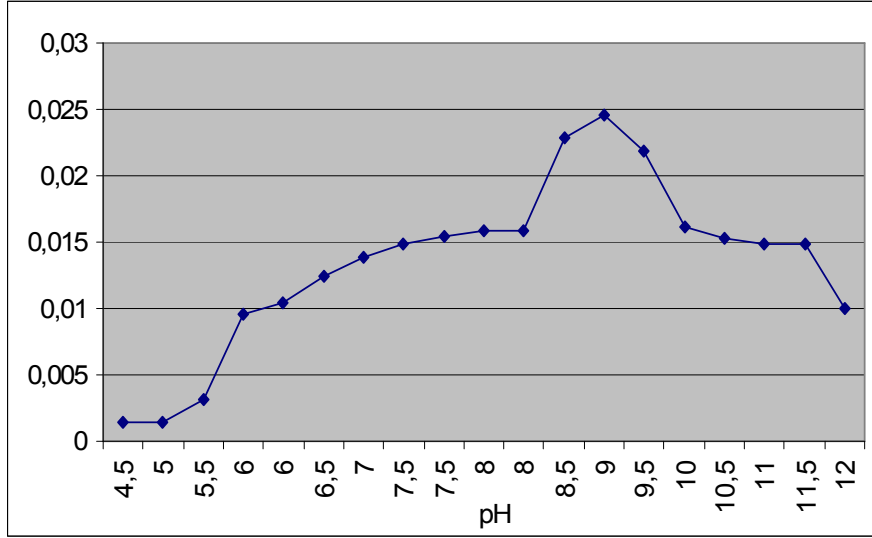
Şekil 10. *E.coli* BL21(DE3)'de üretilen *kitinaz B* genine ait SDS-PAGE analizi. (M: Protein Markırı (Promega), 1: *E.coli* BL21(DE3)'de IPTG ile indüklenmiş pET-28a(+)- *chiB*, 2: *E.coli* BL21(DE3)'de IPTG ile indüklenmiş pET-28a(+), 3: *E.coli* BL21(DE3) hücre proteinleri



Şekil 11. *E.coli* BL21(DE3)'de üretilen *kitinaz C* genine ait SDS-PAGE analizi. (1: *E.coli* BL21(DE3) hücre proteinleri, 2: *E.coli* BL21(DE3)'de IPTG ile indüklenmiş pET-28a(+), 3: *E.coli* BL21(DE3)'de IPTG ile indüklenmiş pET-28a(+)- *chiC*, M: Protein Markırı (Promega))

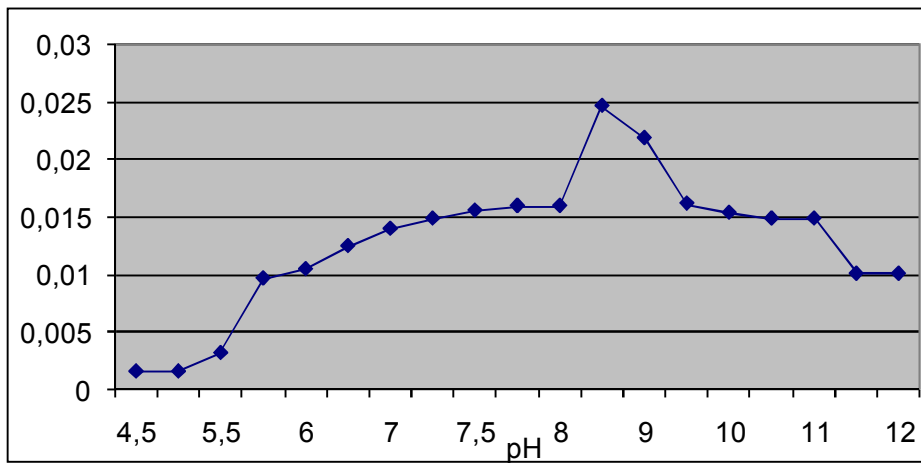
3.8. Kitinaz Enzimlerinin Optimum pH'larının Belirlenmesi

pH'nın kitinaz aktivitesi üzerine etkisi pH 4,5 – 12,0 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile incelendi. Elde edilen aktivite ölçümlerine göre pH-Aktivite grafiği oluşturuldu. Şekil 12'de görüldüğü üzere kitinaz B aktivitesi en yüksek 9,0 pH'ya sahip tamponda gözlemlendi.



Şekil 12. Kitinaz B enziminin farklı pH'lardaki aktivitesi

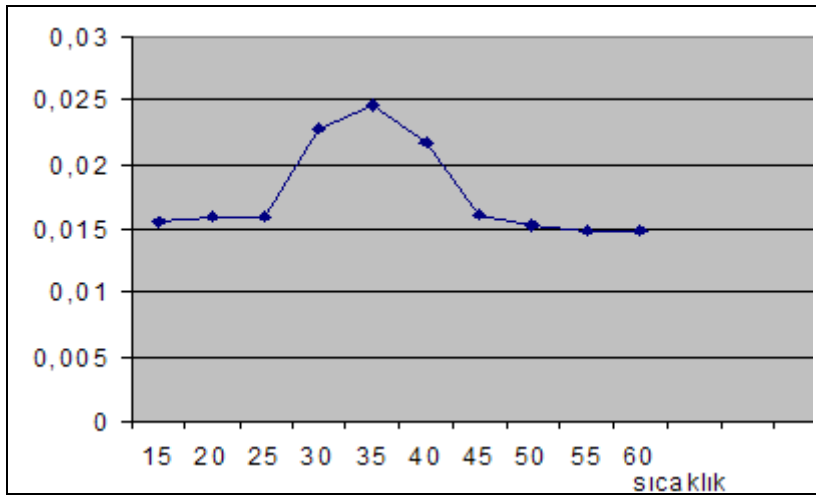
Şekil 13'de de görüldüğü gibi kitinaz C en yüksek aktiviteyi pH 8,5' ta gösterdi.



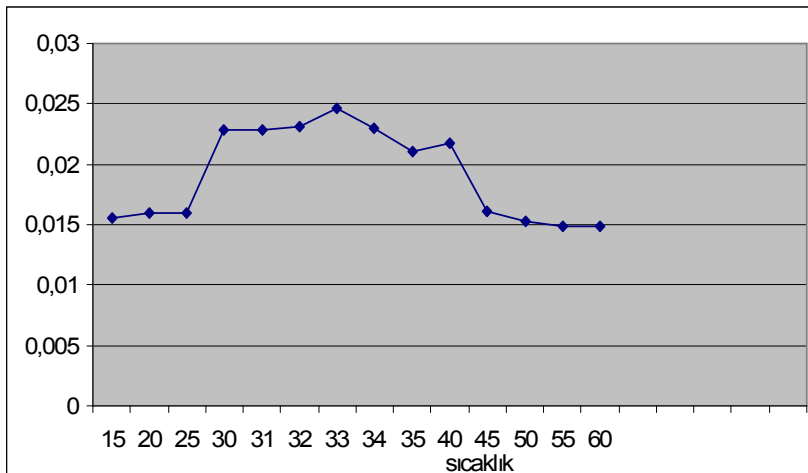
Şekil 13. Kitinaz C enziminin farklı pH'lardaki aktivitesi

3.9. Kitinaz Enzimlerinin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Kitinaz'ın 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60°C'lerde aktiviteleri ölçülerek enzimin çalışmalarına sıcaklığın etkisi araştırıldı ve sıcaklık-aktivite grafiği oluşturuldu. Kitinaz B için 35 °C'de sonuç alınırken (Şekil 14), kitinaz C için 30-35 °C aralığında birbirine çok yakın değerler elde edildi. Bu nedenle daha doğru bir optimum sıcaklık belirlemek için deney 31, 32, 33 ve 34°C'lerde tekrarlandı. Bu sıcaklıklarda ölçülen aktivitelere göre oluşturulan sıcaklık-aktivite grafiği Şekil 15'de gösterildi. Sonuç olarak kitinaz C enziminin optimum sıcaklığı 33°C olarak belirlendi.



Şekil 14. Kitinaz B enzimine ait sıcaklık grafiği



Şekil 15. Kitinaz C enzimine ait sıcaklık grafiği

4. TARTIŞMA

Bakteriler tarafından üretilen kitinazın bakterideki rolü, kitini karbon (C) ve enerji kaynağı olarak kullanma amacına yöneliktir (Roberts ve Selitrennikoffh, 1988; Leah vd., 1995). Bakteriler arasında *Streptomyces* (özellikle *S. griseus*) *Serratia*, *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Chitinophaga*, *Cytophaga* ve *Lasobacter* türleri potansiyel kitinaz üreticileridirler (Thamthiankul vd., 2001; Okay, 2005; Kuzu, 2008).

Bakteriyel kitinazlar ile ilgili çalışmalar-biyokimyasal özellikleri, bunları kodlayan genler, katalitik mekanizmaları, üç boyutlu yapıları hızlı bir şekilde çoğalmaktadır (Watanabe vd., 1997). Bakteriyel kitinazlar en fazla *Serratia* cinsi bakterilerle çalışılmaktadır.

Literatüre bakıldığında bakteriyel kitinazlar arasında birkaç *kitinaz* genini bir arada barındıran birkaç örnek bulunmaktadır. Literatürde şimdiye kadar tespit edilen bakteriyel kitinazlar arasında *Bacillus circulans* WL-12 suşu *kitinaz* A, C ve D genlerini bir arada bulunmaktadır (Alam vd., 1996). *Serratia marcescens* 2170 suşunun *kitinaz* A, B ve C1 genlerini bir arada bulundurduğu tespit edilmiştir (Suzuki vd. 2002).

Bu çalışmada kullanılan *Serratia marcescens* Ha bakterisi dünya'da büyük bir tarım zararlısı olan *Helicoverpa armigera*'dan izole edilmiş ve *kitinaz* A, B ve C dejenerat primerleri ile bu bakteri DNA'sından *kitinaz* genleri çoğaltılmıştır.

Bu nedenle, entomopatojenik bir bakteri olan *Serratia marcescens* bakterisinin öncelikle agar difüzyon metodu ile *kitinaz* aktivitesi gözlemlendi. İçerdiği *kitinaz* genlerinin tespit edilebilmesi için dejenerat primerler dizayn edilerek PCR ile genler çoğaltılmış ve pGEMT easy vektöre klonlanmıştır. Elde edilen doğru klonlar DNA dizin analizine gönderilerek gelen sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda genlerin tam sırası belirlenmiş ve *kitinaz* A, B ve C genleri olduğu belirlenmiştir. Bu sıra literatürde bulunan diğer *kitinaz* genleri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonuçlarına göre *S. marcescens* Ha *kitinaz* A geni gen bankasındaki *S.marcescens* (BJL200) *chiA* genine %99, *Serratia marcescens* Bn10 endochitinase (*chiA*) genine %98, *Serratia marcescens* C8-8 suşuna ait (*chiA*) genine %97 ve *Serratia marcescens* ATCC 990 (*chiA*) genine %96 oranında benzerlik göstermektedir. *kitinaz* B, gen bankasında ki *S.marcescens* (BJL200) *chiB* genine %97, *Serratia marcescens* *chiB* genine %95, *Serratia marcescens* *chiB* genine %95 ve *Serratia marcescens* (*chiB*) genine %91 oranında benzerlik göstermektedir. *kitinaz* C ise, gen

bankasında ki *Serratia marcescens chiC1* genine %98, *Serratia marcescens (chiC)* genine %96, *Serratia marcescens chiC* genine %96 ve *Serratia marcescens* 141 suşuna ait (*chiC*) genine %95 oranında benzerlik göstermektedir.

Şu ana kadar farklı konaklardan izole edilen *kitinaz* genleri *Escherichia coli*'de ve *Bacillus thuringiensis*'de ekspres edilmiştir (Sitrit vd., 1995; Lonhienne vd., 2001).

Okay ve arkadaşları (2008) *Serratia marcescens kitinaz A* genini *Bacillus thuringiensis*' e aktarmışlar ve *kitinaz* geninin *B. thuringiensis*'de orijinal konağından daha fazla ekspres edildiğini ayrıca *B. thuringiensis*'de ki plazmid kararlılığının test edilen 240 generasyon süresi boyunca devam ettiğini gözlemlemişler.

Kolay çalışılabilir olması, daha önce yapılan çalışmalarda verimli sonuçlar alınması ve rahat elde edilebilmesi nedeniyle bu çalışmada klonlama ve ekspresyon için konak olarak *E.coli* kullanılmıştır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, *Serratia marcescens* bakterisinin *kitinaz A, B ve C* genleri tam olarak elde edildikten sonra genlerin ekspresyonu için indüklenebilir T7 RNA polimeraz promotörü içeren pET-28a(+)’ya klonlanarak *Escherichia coli* BL21(DE3) konak hücresinde ekspres edilmişlerdir. Ekspres edilen proteinlerin büyüklükleri *kitinaz A* için yaklaşık 57 kDa, *kitinaz B* için yaklaşık 53 kDa ve *kitinaz C* için yaklaşık 50 kDa civarında olduğu SDS-PAGE analizi ile belirlenmiştir.

Elde edilen enzimlerin aktivite varlığı tespit edildikten sonra çalıştıkları uygun pH ve sıcaklıkları tespit edildi. *Kitinaz A*'nin aktivitesi tespit edilemedi. SDS-PAGE sonucuna göre bant görülmesine rağmen, sinyal peptidinin bulunmasından dolayı aktivite gözlenemedi. Okay vd.'nin 2008 yılında yaptıkları çalışmada *kitinaz A* genini sinyalli bir şekilde ekspres etmişlerdir. Fakat bunun için rekombinant bir vektör kullanmışlardır. Diğer bir çalışmada ise *Bacillus licheniformis A1* suşunda bulunan *kitinaz* geni sinyalsiz bir şekilde çoğaltılarak sinyali bulunmayan bir vektörde ekspres edilmiştir (Sandallı vd.,2008). Böylelikle enzim hücre içinde kalmış olup aktivitesine bu şekilde bakılabilir. Bundan yola çıkılarak yine sinyalsiz şekilde çoğaltılan genin sinyalli bir vektörde de ekspres edilerek enzimin hücre dışına atılması sağlanabilir. Literatüre bakıldığında, yapılan çalışmalara göre elimizdeki klonun ve diğer elde ettiğimiz klonların sekansları tekrardan yapılarak bir hata olup olmadığı yeniden kontrol edilebilir. Sekans sonucuna göre, yeni bir klondan yeniden ekspresyon çalışmalarına devam edilerek bu enzimin de tanımlanması yapılabilir. Literatürde olduğu gibi sinyalsiz bir şekilde çoğaltılarak ve klonun sırasından emin olunarak sinyal içermeyen bir vektörde ekspresyonu gerçekleştirilebilir.

Diğer enzimler ise, kitinaz B pH 9'da ve kitinaz C ise pH 8,5'da en iyi aktiviteyi vermektedir. Lee vd. (2006) *Bacillus* sp. DAU101 suşuna ait kitinazın pH=7,5 (nötral), Guo vd. (2004) *Aeromonas schubertii*'den izole ettikleri kitinazın pH=4,8'de (asidik) maksimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Vaidya vd. (2003), *Alcaligenes xylosoxydans* kitinazı ile çalışmışlar ve enzim pH=5,0'da optimum aktivite göstermiştir. Bushan ve Hoondal (1998) *Bacillus* kitinazlarının geniş pH 7,5-9,0 aralığında optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Wiwat vd. (1999) *Bacillus circulans* No.4.1 suşuna ait kitinazın pH=8,0'de optimum aktivite gösterdiğini, *Alteromonas* sp. O-7 suşuna ait kitinazın benzer özellikler gösterdiğini (Tsujiyo vd., 1992) bildirmişlerdir. Yuli vd. (2004) *Bacillus* sp. 13,26 suşuna ait kitinazın nötral pH'da optimum aktivite gösterdiğini ve *Pseudomonas aeruginosa* K-187 (Wang ve Chang, 1997) suşuna ait kitinaza benzediğini bildirmişlerdir. *Beauveria bassina*'dan elde edilen kitinaz pH=9,2'de oldukça aktif olup (Suresh ve Chandrasekaran, 1999) bu çalışmada izole edilen kitinaz B optimum pH= 9,0'da aktivite göstermektedir. Watanabe vd. (1992) ve Yabuki vd.'ne göre (1986) pek çok kitinazın asidik, Ohishi vd. (1996) ve Ueda ve Arai'a göre (1992) pek çok kitinazın alkali olduğu, *B. circulans* No.4.1'in (Wiwat vd., 1999) ve *B. circulans* WL-12'nin (Watanabe vd., 1992) alkali olduğu saptanmıştır. Alkali kitinazlar, *B. thuringiensis* temelli biyopestisid (lepidoptera larvalarının biyokontrolünde) üretiminde oldukça kullanışlı bir enzimdir Çünkü lepidoptera larvalarının bağırsakları alkali pH'dadır (Berenbaum, 1980).

Enzimlerin çalıştığı uygun sıcaklıklara bakıldığında ise kitinaz B'nin 35 ve kitinaz C'nin ise 33°C'de en iyi aktivite gösterdikleri görülmektedir. Lee vd. (2006) *Bacillus* sp. DAU101 suşundan izole ettikleri kitinazın optimum sıcaklık aktivitesini 60 °C, Vaidya vd. (2003), *Alcaligenes xylosoxydans* kitinazı'nın 50 °C, Bushan ve Hoondal (1998) *Bacillus* kitinazlarının 45-55 °C'de optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Wiwat vd. (1999) *Bacillus circulans* No.4.1 suşuna ait kitinazın 40 °C ve optimum aktivite gösterdiğini, *Alteromonas* sp. O-7 suşuna ait kitinazın benzer özellikler gösterdiğini (Tsujiyo vd., 1992) bildirmişlerdir.

Yuli vd, (2004), Endonezya'nın Tompaso sıcak su kaynağından kitinaz üreten bir bakteri izole etmişlerdir. 16SRNA sekans analizine göre; bu Gr (+), spor üreten, çubuk şekilli, bakteri *Bacillus* sp. 13.26 olarak adlandırılmıştır. Bakteri %5'lik kitin içeren besiyerinde 72 saat 55 °C'de üretildiğinde ekstrasellüler kitinaz üretmiştir. Enzimi NH₄SO₄ (amonyum sülfat) yöntemi ile saflaştırmışlar ve saf enzim moleküler ağırlığı SDS-PAGE'de 60 kDa olarak saptanmıştır. Optimum sıcaklık 60°C ve optimum pH 7.8 olarak bulunmuştur. 70 °C 5

saat ön inkübasyondan sonra kitinaz aktivitesi korunmuştur. Zimogram analizleri ile de enzimin termal stabilitesi doğrulanmıştır. 80 °C’de 1 saatlik inkübasyondan sonra enzim önemli derecede korunmuştur.

Bazı bitki büyümesini teşvik edici bakterilerde kitinaz üretmektedirler. Yapılan bir çalışmada bitkiler bu suşlarla muamele edilmiş ve bitkilerin zararlı bir mantar olan *R. solani* ile enfeksiyondan korundukları gözlenmiştir. Bu denemede kitinaz negatif olarak kullanılan suşun fungal patojene karşı herhangi bir koruma kapasitesi olmadığı belirlenmiş ve fungal patojene karşı aktif elementin kitinaz olduğu net bir şekilde anlaşılmıştır. Böylece aktivitesi ve moleküler özellikleri amaca uygun olan bir *kitinaz* geni bitki büyümesini teşvik eden bakterilere klonlanarak bitki gelişim ve korunmasını sağlamaktadır (Radjacommare vd., 2004).

Sonuç olarak böcekten izole edilen bir bakteriden elde edilen enzimlerin bulunan sıcaklıklarda en iyi aktivite göstermeleri beklenen bir durumdur. Aktivite gösterdikleri pH’ların da bazik olması biyopestisid üretiminde oldukça kullanışlı enzimler olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda *Helicoverpa armigera*'dan izole edilen *Serratia marcescens* Ha bakterisine ait *kitinaz* A, B ve C genlerinin klonlanması, karakterizasyonu, ekspresyonu ve enzim aktivitesi ile enzim karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Serratia marcescens bakterisine ait *kitinaz* A, *kitinaz* B ve *kitinaz* C genleri, dizayn edilen dejenerat primerler yardımıyla çoğaltıldı ve pGEMT Easy klonlama vektörüne klonlanarak baz dizilimi belirlendi. *kitinaz* A geni, 1692 bp büyüklüğünde olup 563 aa, *kitinaz* B geni, 1500 bp büyüklüğünde olup 499 aa, *kitinaz* C geni ise, 1443 bp büyüklüğünde olup 480 aa içermektedir.

Nükleotid sırasının mevcut genlerle karşılaştırılması sonucunda *kitinaz* A geninin *S.marcescens* (BJL200) *chiA* genine %99 oranında, *kitinaz* B geninin *S.marcescens* (BJL200) *chiB* genine %97 oranında ve *kitinaz* C geninin de *S.marcescens chiC1* genine %96 oranında benzer olduğu tespit edildi.

Genlerin ekspresyonunu sağlamak için öncelikle bir ekspresyon vektörü olan pET-28a(+)’ya klonlandı ve *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinde proteinlerin üretimleri gerçekleştirildi. Daha sonra SDS-PAGE analizi yapılarak *kitinaz* A geni için protein büyüklüğünün yaklaşık 57kDa’luk, *kitinaz* B için protein büyüklüğünün yaklaşık 53 kDa ve *kitinaz* C için de protein büyüklüğü yaklaşık olarak 50 kDa olduğu gözlemlendi.

Elde edilen bu enzimlerin çalışabileceği optimum pH ve sıcaklık aralıklarına bakıldı ve *kitinaz* B’nin pH 9’da, 35°C’de ve *kitinaz* C’nin pH 8,5’da 33°C’de en iyi aktivite gösterdikleri tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Zararlı böceklerle mücadelede kimyasal insektisitlere en iyi alternatif biyoinspektisitlerdir. Bu anlamda biyolojik mücadele için en çok kullanılan mikroorganizmalar bakterilerdir.

Yıllardan beri entomopatojenik bir bakteri olan *Serratia marcescens* üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış ve hala daha yapılmaktadır. Böylece tarım alanlarında ve ormanlarda zarara yol açan böcekler etkisiz hale getirilebilmektedir. Bu anlamda *Serratia marcescens* bakterisinin ve bakteride bulunan *kitinaz* genlerinin moleküler düzeyde aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Tanımlanamayan *kitinaz* A geninin yeniden sekansı yapılabilir ve sekans sonucuna göre, yeni bir klondan yeniden ekspresyon çalışmalarına devam edilerek bu enzimin de tanımlanması yapılabilir. Literatürde olduğu gibi sinyalsiz bir şekilde çoğaltılarak ve klonun sırasından emin olunarak sinyal içermeyen bir vektörde ekspresyonu gerçekleştirilebilir. Bu çalışmada moleküler özellikleri belirlenen *kitinaz* genleri, başta izole edilen konağı olan *Helicoverpa armigera* olmak üzere Lepidoptera grubu zararlılar üzerinde ve Coleoptera gibi diğer zararlı grupları üzerinde etkilerinin test edilmesi, böcekler üzerindeki etkileri artırmak amacıyla yine böcekler üzerinde etkili olan farklı genlerle (*cry* genleri, *cyt* genleri ve *kitinaz* gibi) bir araya getirilerek füzyon protein oluşturulabilir. Literatürde benzer çalışmalar bulunmakta olup bu şekilde böcekler üzerindeki insektisidal aktiviteyi arttırmak ve böceklerin toksinlere olan dirençliliğini önlemek amaçlanmaktadır (Khasdan vd., 2007). Elde edilen enzimlerin karakterizasyonu daha ayrıntılı bir biçimde yapılarak endüstriyel alanda kullanım için geliştirilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Aehle, W., 2004. *Enzymes in Industry. Production And Applications.* Wiley-Vch Verlag Gmbh &Co. Kгаа. Weinheim.
- Alam, M.M., Mizutani, M., Isono, T., Nikaidou, N. ve Watanabe, T., 1996. Three *chitinase* genes (*chiA*, *chiC* and *chiD*) comprise the chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12. J Ferment Bioeng, 82, 28–36.
- Berenbaum, M., 1980. Adaptive significance of midgut pH in larval lepidoptera. Am. Nat., 115, 138-146.
- Bhushan, B. ve Hoondal, G. S., 1998. Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. Biotechnol. Lett, 2, 157-159.
- Botha, A. M., Nagel, M. A. C., Van der Westhuizen A. J. ve Botha, F. C., 1998. Chitinase isoenzymes in near-isogenic wheat lines challenged with Russian wheat aphid, exogenous ethylene, and mechanical wounding. Bot Bull Acad Sin, 39, 99-106.
- Brurberg, M. B., Eijsink V. G. ve Nes I. F., 1994. Characterization of a *chitinase* gene (*chiA*) from *Serratia marcescens* B JL200 and one-step purification of the gene product. FEMS Microbiol Lett, 124, 3, 399-404.
- Brurberg, M. B., Eijsink V. G., Haandrikman A. J., Venema G. ve Nes I. F., 1995. Chitinase B from *Serratia marcescens* B JL200 is exported to the periplasm without processing. Microbiology, 141, 1, 123-131.
- Brurberg, M. B., Nes I. F. ve Eijsink V. G., 1996. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. Microbiology, 142, 7, 1581–1589.
- Brurberg, M. B., Synstad, B., Klemsdal, S. S., van Aalten, D. M. F., Sundheim, L. ve Eijsink, V. G. H., 2000. Chitinases from *Serratia marcescens*. Rec Res Dev Microbiol, 5, 187–204.
- Cassidy, R. A., Natarajan, S. ve Vaughan, G. M., 2005. The link between the insecticide heptachlor epoxide, estradiol, and breast cancer. Breast Cancer Res Treatm, 90, 55–64.
- Cohen-Kupiec, R. ve Chet, I., 1998. The molecular biology of chitin digestion. Curr Opin Biotechnol, 9, 3, 270–277.
- Da Silva Amorim, R. V., de Souza, W., Fukushima, K. ve de Campos-Takaki, G. M., 2001. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. Braz J Microbiol, 32, 20-23.

- Favaloro, J., Treisman, R., Kamen, R., In Grosman, L. ve Moldave, K., 1980. Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 65, 718.
- Fuchs, R. L., Mcpherson, S. A. ve Drahos, D. J., 1986. Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. Appl Environ Microbiol, 51, 504-509.
- Goodenough, P. W., In Tucker, G. A. ve Woods, L. F. J., 1995. Enzyme in Food Processing, 2nd ed., Blakie Academic & Professional (imprint of Chapman & Hall), New York, 41.
- Guo, S. H., Chen, J. K. ve Lee, W. C., 2004. Purification and characterization of extracellular chitinase from *Aeromonas schubertii*. Enzyme and Microbial Technology, 35, 550-556.
- Hebeda, R. E. ve Hui, Y. E., 1992. Encyclopedia of food and science technology, Wiley, New York, 4, 2490.
- Hoell, I. A., Klemsdal, S. S., Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J. ve Eijsink, V. G. H., 2005. Overexpression and characterization of a novel chitinase from *Trichoderma atroviride* strain P1. BBA-Proteins&Proteomics, 1748, 2, 180-190.
- Inglis, G. D., Lawrence, A. M. ve Davis, F. M., 2000. Pathogens associated with southwestern corn borers and southern corn stalk borers (Lepidoptera: Crambidae). J Econ Entomol, 93, 6, 1619-1626.
- Khasdan, V., Sapojnik, M., Zaritsky, A., Horowitz, A. R., Boussiba, S., Rippa, M., Manasherob, R. ve Ben-Dov, E., 2007. Larvicidal Activities Against Agricultural Pests of Transgenic *Escherichia coli* Expressing Combinations of Four Genes from *Bacillus thuringiensis*, Arch Microbiol., 188, 6, 643-653.
- Kuzu, S. B., 2008. Kitinaz Üreten *Bacillus* İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Cukurova Üniversitesi.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.
- Leah, R., Tommerup, H., Svendsn, Ib., ve Mundy, J., 1995. Biochemical and molecular characterisation three barley seed proteins with antifungal properties. J. Biol. Chem, 266, 1564-1573.
- Lee, Y. S., Park, I. H., Yoo, J. S., Chung, S. Y, Lee, Y. C., Cho, Y. S., Ahn, S. C., Kim, C. M. ve Choi, Y. L., 2006. Cloning, Purification, and Characterization of Chitinase From *Bacillus* sp. DAU101, Bioresource Technology, 98,14, 2734-2741.
- Lewis, W. J., van Lenteren, J. C., Phatak, S. C. ve Tumlinson, J. H., 1997. A total system approach to sustainable pest management. Proc Natl Acad Sci, 94, 12243–12248.

- Lonhienne, T., Mavromatis, K., Vorgias, C. E., Buchon, L., Gerday, C. ve Bouriotis, V., 2001. Cloning, sequences, and characterization of two *chitinase* genes from the antarctic *Arthrobacter* sp. strain TAD20: isolation and partial characterization of the enzymes. J Bacteriol, 183, 1773-1779.
- Montesinos, E., 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. Int Microbiol, 6, 245–252.
- Muzzarelli, R. A. A., 1977. Chitin. Pergamon Pres, 163.
- Nawani, N. N. ve Kapadnis B. P., 2001. One-step purification of chitinase from *Serratia marcescens* NK1, a soil isolate. J Appl Microbiol, 90, 5, 803–808.
- Ohishi, K., Yamagishi, M., Ohta, T., Suzuki, M., Izumida, H., Sano, H., Nishijima, M. ve Miwa, T. 1996. Purification and properties of two chitinases from *Vibrio alginolyticus* H-8. J. Ferment Bioeng., 82, 598- 600.
- Okay, S., 2005. *kitinaz A* geninin (*chiA*) *Serratia marcescens* Bn10'dan klonlanması ve Coleoptera-spesifik *Bacillus thuringiensis*'te ifade edilmesi. Yüksek Lisans Tezi, ODTU.
- Okay, S., Tefon, B. E., Özkan M. ve Özcengiz G. 2008. Expression of *chitinase A (chiA)* gene from a local isolate of *Serratia marcescens* in Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*. J Appl. Microbiol., 104, 161–170.
- Radjacomare, R., Kandan, A., Nandakumar, R. ve Samiyappan, R., 2004. Association of the Hydrolytic Enzyme Chitinase Against *Rhizoctonia solani* in Rhizobacteria-treated Rice Plants, J. Phytopathol., 152, 365-370.
- Roberts, W. K. ve Selitrennikoff, C. P., 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. J Gen Microbiol, 134, 169-176.
- Ruiz-Sánchez, A., Cruz-Camarillo, R., Salcedo-Hernández, R. ve Barboza-Corona, J. E., 2005. Chitinases from *Serratia marcescens* Nima. Biotechnol Lett, 27, 649-653.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Baskı: 2, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sampson, M. N. ve Gooday, G. W., 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. Microbiology, 144, 2189–2194.
- Sandallı, C., Kacagan M., Canakcı S. ve Belduz A. O., 2008. Cloning, expression, purification and characterisation of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* A1. Annals of Microbiology, 58, 2, 245-251.
- Schreinemachers, D. M., 2003. Birth malformations and other adverse perinatal outcomes in four U.S. wheat-producing states. Environ Health Perspect, 111, 1259-1264

- Shen, Z. ve Jacobs-Lorena, M., 1997. Characterization of a novel gut-specific *chitinase* gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. J Biol Chem, 272, 46, 28895–28900.
- Sitrit, Y., Vorgias, C. E., Chet, I. ve Oppenheim, A. B., 1995. Cloning and primary structure of the *chiA* gene from *Aeromonas caviae*. J Bacteriol, 177, 4187-4189.
- Souza, R. F., Gomes, R. C., Coelho, R. R. R., Alviano, C. S. ve Soares, R. M. A., 2003. Purification and characterization of an endochitinase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. FEMS Microbiol Lett, 222, 45-50.
- Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Prinz, H., Estibeiro, P., Duncan, R. R., Svasti, J. ve Fothergill-Gilmore, L. A., 2004. An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. Arch Biochem Biophys, 424, 171-180.
- Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Svasti, J. ve Prinz, H., 2005. Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of *chitinase* A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. FEBS J, 272, 3376-3386.
- Suresh, P. V. ve Chandrasekaran, M., 1999. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. Process. Biochem., 34, 257-267.
- Suzuki, K., Taiyoji, M., Sugawara, N., Nikaidou, N., Henrissat, B. ve Watanabe, T., 1999. The third *chitinase* gene (*chiC*) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. Biochem J, 343, 587-596.
- Suzuki, K., Uchiyama, T., Suzuki, M., Nikaidou, N., Regue, M. ve Watanabe, T., 2001. LysR-type transcriptional regulator *chiR* is essential for production of allchitinases and a chitin-binding protein, CBP21, in *Serratia marcescens* 2170. Biosci Biotechnol Biochem, 65, 2, 338-347.
- Suzuki K., Sugawara N., Suzuki M., Uchiyama T., Katouno F., Nikaidou N. ve Watanabe T., 2002. *Chitinases* A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: Enzymatic properties and synergism on chitin degradation. Bioscience Biotechnology And Biochemistry, 66, 1075-1083,
- Thamthiankul, S., Suan-Ngay, S., Tantimavanich, S. ve Panbangred, W., 2001. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*. Appl Microbiol Biotechnol, 56, 3, 4, 395-401.
- Trudel, J. ve Asselin A., 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem, 178, 2, 362–326.
- Tsujibo, H., Yoshida, Y., Miyamoto, K., Imada, C., Okami, Y. ve Inamori, Y., 1992. Purification, properties, and partial amino acid sequence of chitinase from a murine *Alteromonas* sp. O-7. Can. J. Microbiol., 38, 891-897.

- Uchiyama, T., Kaneko, R., Yamaguchi, J., Inoue, A., Yanagida, T., Nikaidou, N., Regue, M. ve Watanabe, T., 2003. Uptake of N, N'-Diacetylchitobiose [(GlcNAc)₂] via the phosphotransferase system is essential for chitinase production by *Serratia marcescens* 2170. J Bacteriol, 185, 6, 1776-1782.
- Ueda, M. ve Arai, M. 1992. Purification and some properties of chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. Biosci. Biotechnol. Biochem., 56: 460-464.
- URL_1, http://www.faanistik.net/DETINVERT/MORPHOLOGY/GEWEBE/chitin_01.html 12.05.2009
- URL_2, http://wywy.essortment.com/whatischitin_rkkh.htm. 12.05.2009
- URL_3, <http://dalwoo.com/chitosan/whatischitosan.html>. 12.05.2009
- Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Rao, F. V., Peter, M. G., Synstad, B., van Aalten, D. M. F. ve Eijssink, V. G. H., 2004. Structure of the D142N mutant of the family 18 chitinase ChiB from *Serratia marcescens* and its complex with allosamidin. BBA - Proteins&Proteomics, 1696, 103-111.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M. F., Synstad, B. ve Eijssink, V. G. H., 2005. The non-catalytic chitin-binding protein Cbp21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. J Biol Chem, 280, 31, 28492-28497.
- Vaidya, R., Roy, S., Macmil, S., Gandhi, S., Vyas, P. ve Chhatpar, H. S., 2003. Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes xylosoxydans*. Biotechnology Letters, 25, 715-717.
- Wang, S. L., ve Chang, W. T., 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. Appl. Environ. Microbiol., 63, 2, 380-386.
- Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., Ohnishi, K. ve Tanaka, H., 1992. Structure of gene encoding chitinase -D, *Bacillus circulans* Wild type 12, and possible homology of the enzyme to other procaryotic chitinase and class-3 plant chitinases. J.Bacteriol, 174, 408-414.
- Watanabe, T., Kimura, K., Sumiya, T., Nikaidou, N., Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Ferrer, S. ve Regue, M., 1997. Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. J Bacteriol, 179, 7111-7117.
- Wen, C. M., Tseng, C. S., Cheng C. Y. ve Li, Y. K., 2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. Biotechnol Appl Biochem, 35, 213-219.
- Wiwat, C., Siwayaprahm, P. ve Bhumratana, A., 1999. Purification and Characterization of Chitinase From *Bacillus circulans* no.4.1., Current Microbiology, 39, 134-140.

- Yabukı, M., Mizushima, K., Amatatsu, T., Ando, A., Fujii, T., Shimada, M. ve Yamashita, M., 1986. Purification and characterization of chitinase and chitobiose produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes*. J. Gen. Appl. Microbiol., 32, 25-38.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B., 2007. Moleküler Biyoloji, Nobel Bilim Ve Araştırma Merkezi Yayın No:2.
- Yuli, E. P., Suhartono, T., Rukayadi, Y., Hwang, J. K. ve Pyun, R. Y., 2004. Characteristics of Thermostable Chitinase Enzymes From the Indonesan *Bacillus* sp. 13.26, Enzyme and Microbial Technology, 35, 147-153.

8. EKLER

```
AAG GCC AAT CCG CTC CGG CCG CAT GGC GGC CGC GGG AAT TCG ATT ATT
CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA GAT TGA ACG CTG GCG GCA GGC TTA ACA
CAT GCA AGT CGA GCG GTA GCA CAG GGG AGC TTG CTC CCT GGG TGA CGA
GCG GCG GAC GGG TGA GTA ATG TCT GGG AAA CTG CCT GAT GGA GGG GGA
TAA CTA CTG GAA ACG GTA GCT AAT ACC GCA TAA CGT CGC AAG ACC AAA
GAG GGG GAC CTT CGG GCC TCT TGC CAT CAG ATG TGC CCA GAT GGG ATT
AGC TAG TAG GTG GGG TAA TGG CTC ACC TAG GCG ACG ATC CCT AGC TGG
TCT GAG AGG ATG ACC AGC CAC ACT GGA ACT GAG ACA CGG TCC AGA CTC
CTA CGG GAG GCA GCA GTG GGG AAT ATT GCA CAA TGG GCG CAA GCC TGA
TGC AGC CAT GCC GCG TGT GTG AAG AAG GCC TTC GGG TTG TAA AGC ACT
TTC AGC GAG GAG GAA GGT GGT GAA CTT AAT ACG TTC ATC AAT TGA CGT
TAC TCG CAG AAG AAG CAC CGG CTA ACT CCG TGC CAG CAG CCG CGG TAA
TAC GGA GGG TGC AAG CGT TAA TCG GAA TTA CTG GGC GTA AAG CGC ACG
CAG GCG GTT TGT TAA GTC AGA TGT GAA ATC CCC GGG CTC AAC CTG GGA
ACT GCA TTT GAA ACT GGC AAG CTA GAG TCT CGT AGA GGG GGG TAG AAT
TCC AGG TGT AGC GGT GAA ATG CGT AGA GAT CTG GAG GAA TAC CGG TGG
CGA AGG CGG CCC CCT GGA CGA AGA CTG ACG CTC AGG TGC GAA AGC GTG
GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC ACG CTG TAA ACG ATG
TCG ATT TGG AGG TTG TGC CCT TGA GGC GTG GCT TCC GGA GCT AAC GCG
TTA AAT CGA CCT CTG GGG AGT ACG GCC GCA AGG TTA AAA CTC AAA TGA
ATT GAC GGG GGC CCG CAC AAG CGG TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG ATG
CAA CGC GAA GAA CCT TAC CTA CTC TTG ACA TCC AGA GAA CTT AGC AGA
GAT GCT TTG GTG CCT TCG GGA ACT CTG AGA CAG GTG CTG CAT GGC TGT
CGT CAG CTC GTG TTG TGA AAT GTT GGG TTA AGT CCC GCA ACG AGC GCA
ACC CTT ATC CTT TGT TGC CAG CGG TTC GGC CGG GAA CTC AAA GGA GAC
TGC CAG TGA TAA ACT GGA GGA AGG TGG GGA TGA CGT CAA GTC ATC ATG
GTC CTT ACG AGT AGG GCT ACA CAC GTG CTA CAA TGG CGT ATA CAA AGA
GAA GCG ACC TCG CGA GAG CAA GCG GAC CTC ATA AAG TAC GTC GTA GTC
CGG ATT GGA GTC TGC AAC TCG ACT CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG TAA
TCG TAG ATC AGA ATG CTA CGG TGA ATA CGT TCC CGG GCC TTG TAC ACA
CCG CCC GTC ACA CGG TAC CAT AAT CAC TAG TGA ATT CGC GGC CGC CTG
CAG GTC GAC CAT ATG GAG AGC TCC CAA CGC GTG ATC AGC G
```

Ek Şekil 1. *Serratia marcescens* Ha bakterisine ait 16S rRNA dizin analizi sekans sonucu

ATG CGC AAA TTT AAT AAA CCG CTG TTG GCG CTG TTG ATC GGC AGC ACG
CTG TGT TCC GCG GCG CAG GCC GCC GCG CCG GGC AAG CCG ACC ATC GCC
TGG GGC AAC ACC AAG TTC GCC ATC GTT GAA GTT GAC CAG GCG GCT ACC
GCT TAT AAT AGT TTG GTG AAG GTA AAA AAT GCC GCC GAT GTT TCG GTC
TCC TGG AAT TTA TGG AAT GGC GAC ACC GGT ACG ACG GCA AAA GTT TTA
TTA AAT GGC AAA GAG GCG TGG AGC GGC CCG TCA ACC GGT TCT TCC GGT
ACG GCG AAT TTT AAA GTC AAT AAA GGC GGC CGT TAT CAA ATG CAG GTG
GCA TTG TGC AAT GCC GAC GGC TGC AGC GCC AGC GAC GCC ACC GAA ATT
GTG GTG GCC GAC ACC GAC GGC AGC CAT TTG GCG CCG TTG AAA GAG CCG
CTG CTG GAA AAG AAT AAA CCG TAT AAA CAG AAC TCC GGC AAA GTC
GTC GGT TCT TAT TTC GTC GAG TGG GGC GTT TAC GGG CGC AAT TTC ACC
GTC GAC AAG ATC CCG GCG CAG AAC CTG ACC CAC CTG CTG TAC GGC TTT
ATC CCG ATC TGC GGC GGC AAC GGC ATC AAC GAC AGC CTG AAA GAG
ATC GAA GGC AGC TTC CAG GCG CTG CAG CGC TCC TGC CAG GGC CGC GAG
GAC TTC AAA GTC TCG ATC CAC GAT CCG TTC GCC GCG TTG CAA AAA GCG
CAG AAG GGC GTT ACC GCC TGG GAT GAC CCC TAC AAG GGC AAC TTC GGC
CAG CTG ATG GCG CTG AAA CAG GCG CAT CCT GAC CTG AAA ATT CTG CCG
TCG ATC GGC GGT TGG ACG CTG TCC GAC CCG TTC TTC TTC ATG GGC GAT
AAG GTG AAG CGC GAT CGC TTC GTC GGT TCG GTG AAA GAG TTC CTG CTG
ACC TGG AAG TTC TTC GAT GGC GTG GAT ATC GAC TGG GAG TTC CCG GGC
GGC AAA GGC GCC AAC CCG AAC CTG GGC AGC CCG CAG GAC GGG GAA
ACC TAT GTG CTG CTG ATG AAG GAG CTG CGG GCG ATG CTG GAT CAG CTG
TCG GCG GAA ACT GGC CGC AAA TAT GAA CTG ACC TCC GCC ATC AGC GCC
GGC AAG GAC AAG ATC GAT AAG GTG GCT TAC AAC GTT GCG CAG AAC
TCG ATG GAT CAC ATC TTC CTG ATG AGC TAC GAC TTC TAT GGC GCC TTC
GAT CTG AAG AAC CTG GGG CAT CAG ACC GCG CTG AA TGC GCC GGC CTG
CAA GCC GGA CAC CGC TTA CAC CAC GGT GAA CGG CGT CAA TGC GCT GCT
GGC GCA GGG CGT CAA GCC GGG CAA GAT CGT GGT CGG CAC CGC CAT
GTA TGG CCG CGG CTG GAC CGG GGT GAA CGG CTA CCA GAA CAA CAT TCC
GTT CAC CGG TAC CGC CAC CGG GCC GGT CAA AGG CAC CTG GGAG AAC
GGC ATC GTG GAC TAC CGC CAA ATC GCC GGC CAG TTC ATG AGC GGC GAG
TGG CAG TAT ACC TAC GAC GCC ACG GCG GAA GCG CCT TAC GTG TTC AAA
CCT TCC ACC GGC GAT CTG ATC ACC TTC GAC GAT GCC CGC TCG GTG CAG
GCC AAA GGC AAG TAC GTG CTG GAT AAG CAG CTG GGC GGC CTG TTC TCC
TGG GAG ATC GAC GCG GAT AAC GGC GAT ATT CTC AAC AGC ATG AAC GCC
AGC CTG GGC AAT AGC GCC GGT GTT CCT TAA

Ek Şekil 2. *Serratia marcescens* Ha bakterisine ait *kitinaz A* geninin DNA sırası (1692bp)

ATG TCC GCA CGC AAA GCG GTT ATT GGG TAT TAT TTT ATT CCA ACC AAC
 CAA ATC AAT AAT TAC ACC GAG TCC GAT ACG TCC GTC GTG CCA TTC CCG
 GTT TCC AAC ATT ACG CCG GCC AAA GCC AAA CAG CTG ACG CAC ATC AAC
 TTC TCG TTC CTG GAT ATC AAC AGC AAC CTG GAA TGC GCC TGG GAT CCG
 GCC ACC AAC GAC GCC AAG GCG CGC GAT GTG GTC AAC CGT CTG ACC GCG
 CTC AAA GCG CAT AAC CCC AGC CTG CGC ATC ATG TTC TCC ATC GGC GGC
 TGG TAC TAC TCC AAC GAT CTG GGC GTG TCG CAC GCC AAC TAC GTC AAT
 GCG GTG AAA ACC CCG GCG TCG CGT ACC AAG TTC GCC CAA TCC TGC GTG
 CGC ATC ATG AAG GAT TAC GGT TTC GAC GGC GTG GAC ATC GAC TGG GAA
 TAC CCG CAG GCG GCG GAA GTG GAC GGC TTC ATC GCC GCG CTG CAA
 GAG ATC CGC ACC CTG CTG AAT CAG CAA ACC GTC GCC GAC GGC CGC CAG
 GCG TTG CCG TAC CAG TTG ACC ATC GCC GGC GCC GGC GGC GCC TTC TTC
 CTG TCG CGC TAT TAC AGC AAG CTG GCG CAG ATC GTC GCG CCG CTC GAT
 TAC ATC AAC CTG ATG ACC TAC GAT CTG GCC GGC CCC TGG GAG AAG GTA
 ACC AAC CAC CAG GCG GCG CTG TTC GGC GAT GCG GCC GGG CCG ACC TTC
 TAC AAC GCG CTG CGC GAA GCC AAC CTG GGC TGG AGC TGG GAA GAG
 CTG ACC CGC GCC TTC CCC AGC CCG TTC AGC CTG ACG GTC GAC GCC GCC
 GTG CAG CAG CAC CTG ATG ATG GAA GGC GTG CCG AGC GCC AAA ATC
 GTG ATG GGC GTG CCC TTC TAC GGC CGC GCC TTC AAG GGC GTC AGC GGC
 GGC AAC GGT GGG CAA TAC AGC AGC CAC AGC ACG CCG GGC GAA GAT
 CCG TAT CCG AGC ACC GAC TAC TGG TTG GTG GGC TGT GAA GAG TGC GTG
 CGC GAC AAG GAT CCG CGC ATC GCC TCC TAT CGC CAG CTG GAG CAG ATG
 CTA CAG GGC AAC TAC GGC TAT CAG CGG CTG TGG AAC GAC AAG ACC
 AAA ACG CCT TAT CTG TAT CAT GCG CAG AAC GGG CTG TTC GTC ACC TAT
 GAC GAT GCC GAG AGC TTC AAA TAC AAA GCG AAA TAC ATC AAG CAG
 CAG CAA CTG GGC GGC GTG ATG TTC TGG CAT CTG GGT CAA GAC AAC CGC
 AAC GGC GAT CTG CTG GCC GCG CTG GAT CGC TAT TTC AAC GCC GCG GAC
 TAC GAC GAC AGC CAG CTG GAT ATG GGC ACC GGG CTG CGC TAC ACC GGC
 GTC GGC CCC GGC AAC CTG CCT ATC ATG ACC GCG CCG GCC TAT GTG CCG
 GGC ACC ACT TAC GCG CAG GGC GCG CTG GTG TCC TAC CAG GGC TAC GTC
 TGG CAG ACC AAG TGG GGG TAC ATC ACC TCT GCG CCG GGT TCA GAC AGC
 GCC TGG CTG AAA GTG GGC CGC CTA GCA **TAA**

Ek Şekil 3. *Serratia marcescens* Ha bakterisine ait *kitinaz* B geninin DNA sırası (1500bp)

ATG AGC ACA AAT AAC ATT ATT AAT GCC GTC GCC GCC GAT GAC GCG GCC
ATT ATG CCG TCT ATC GCC AAT AAA AAG ATC CTG ATG GGT TTC TGG CAC
AAC TGG GCC GCC GGC GCC AGT GAC GGC TAC CAG CAA GGG CAG TTC
GCC AAT ATG AAC CTG ACC GAC ATT CCC GCC GAA TAC AAC GTG GTG GCC
GTC GCC TTT ATG AAA GGC CAG GGC ATC CCG ACT TTC AAG CCT TAC AAC
CTG TCC GAC ACC GAG TTC CGC CGC CAG GTG GGC GTG CTG AAC AGC CAG
GGC CGC GCG GTG CTG ATC TCC CTC GGC GGC GCA GAC GCG CAT ATC GAG
CTG AAA ACC GGC GAC GAA GAC AAG CTG AAA GAC GAG ATT ATT CGC
CTG GTG GAA GTC TAT GGC TTC GAC GGC CTG GAT ATC GAT CTG GAA CAG
GCG GCG ATC GGC GCC GCC AAT AAT AAA ACC GTC TTG CCT GCG GCG TTG
AAA AAA GTA AAA GAC CAT TAC GCC GCG CAG GGA AAA AAC TTT ATT
ATC AGC ATG GCG CCG GAA TTC CCG TAT TTA CGC ACC AAC GGC ATC TAC
CTG GAT TAT ATT AAT GCC CTC GAA GGC TAT TAC GAC TTT ATC GCG CCG
CAA TAT TAT AAC CAG GGC GGC GAC GGT ATT TGG GTG GAT GAA CTC AAT
GCC TGG ATC ACG CAG AAT AAC GAC GCC ATG AAA GAG GAC TTC CTC TAC
TAC CTG ACG GAA AGC CTG GTC ACC GGC ACC CGC GGC TAT GCG AAG ATC
CCG GCG GCG AAA TTC GTC ATC GGC CTG CCA AGC AAC AAC GAT GCC GCC
GCC ACT GGC TAC GTG ATC GAC AAA CAG GCG GTG TAT AAC GCT TTC TCG
CGT CTC GAC GCC AAA AAC CTG TCG ATC AAG GGC CTG ATG ACC TGG TCA
ATC AAC TGG GAC AAC GGC AAG AGC AAA GCC GGC GTC GCC TAC AAT
TGG GAG TTC AAA ACC CGC TAT GCG CCG CTG ATT CAG GGC GGC GTC ACC
CCA CCG CCG GGA AAG CCT AAT GCG CCG ACG GCG CTG ACG GTC GCC
GAG CTG GGC GCC ACC TCG CTG AAA CTG AGC TGG GCC GCC GCC ACC GGC
GCT TTC CCG ATC GCC AGT TAC ACC GTC TAC CGC AAC GGC AAC CCG ATC
GGC CAG ACC GCC GGT CTG TCG CTG GCC GAC GGC GGT CTG ACG CCG GCG
ACC CAG TAC AGC TAC TTC GTT ACC GCG ACC GAT AGC CAG GGC AAT ACC
TCG CTG CCG AGC AGC GCG CTG GCG GTC AAA ACC GCC AAC GAC GGC
ACG CCG CCC GAT CCG GGG GCG CCC GAG TGG CAG AAC AAC CAC AGT
TAC AAG GCT GGC GAC GTG GTG AGC TAT AAA GGC AAG AAA TAT ACC TGT
ATC CAG GCG CAC ACC TCC AAC GCC GGC TGG ACG CCG GAC GCC GCC TTC
ACC CTG TGG CAG CTC ATC GCC TAA

Ek Şekil 3. *Serratia marcescens* Ha bakterisine ait *kitinaz C* geninin DNA sırası (1443bp)

MRKFNKPLLALLIGSTLCSAAQAAAPGKPTIAWGNTKFAIVEVDQAATAYNSLVKVK
 NAADVSVSWNLWNGDTGTTAKVLLNGKEAWSGPSTGSSGTANFKVNGGRYQMQ
 VALCNADGCSASDATEIIVVADTDGSHLAPLKEPLLEKNKPYKQNSGKVVGSYFVEW
 GYYGRNFTVDKIPAQNLTHLLYGFIPICGGNGINDSLKEIEGSFQALQRSCQGREDFKV
 SIHDPFAALQKAQKGVTAWDDPYKGNFGQLMALKQAHPDLKILPSIGGWTLSDPFFF
 MGDKVKRDRFVGSVKEFLLTWKFFDGDVDDWEFPPGGKGANPNLGGSPQDGETYVLL
 MKELRAMLDQLSAETGRKYELTSAISAGKDKIDKVAYNVAQNSMDHIFLMSYDFYG
 AFDLKNLGHQTALNAPACKPDTAYTTVNGVNALLAQGVKPGKIVVGTAMYGRGWT
 GVNGYQNNIPFTGTATGPVKGTWENGIVDYRQIAGQFMSGEWQYTYDATAEAPYVF
 KPSTGDLITFDDARSVQAKGKYVLDKQLGGLFSWEIDADNGDILNSMNASLGNASAG
 VP.

Ek Şekil 5. *Serratia marcescens* Ha bakterisine ait *kitinaz A* geninin aa sırası (563)

MSARKAVIGYYFIPTNQINNYTESDTSVVPFVSNITPAKAKQLTHINFSFLDINSNLEC
 AWDPATNDAKARDVVNRLTALKAHNPSLRIMFSIGGWYYSNDLGVSHANYVNAVK
 TPASRTKFAQSCVRIMKDYGFDGVDIDWEYPQAAEVDGFIAALQEIRTLNQQTVAD
 GRQALPYQLTIAGAGGAFFLSRYYSKLAQIVAPLDYINLMTYDLAGPWEKVTNHQA
 ALFGDAAGPTFYNALREANLGWSWEELTRAFSPFSLTVDAAVQQHLMMEGVPSAK
 IVMGVPFYGRAFKGVSGGNGGQYSSHSTPGEDPYPSTDYWLVGCEECVRDKDPRIAS
 YRQLEQMLQGNYGQRLWNDKTKTPYLHAQNGLFVTYDDAESFKYKAKYIKQQ
 QLGGVMFWHLGQDNRNGDLLAALDRYFNAADYDDSQLDMGTGLRYTGVGPGNLPI
 MTAPAYVPGTTYAQGALVSYQGYVWQTKWGYITSAPGSDSAWLKVGRLA.

Ek Şekil 6. *Serratia marcescens* Ha bakterisine ait *kitinaz B* geninin aa sırası (499)

MSTNNIINAVAADDAAIMPSIANKKILMGFWHNWAAGASDGYQQGQFANMNLTDIP
 AEYNNVAVAFMKGQGIPTFKPYNLSDTEFRRQVGLNSQGRAVLISLGGADAHIELK
 TGDEDKDKDEIIRLVEVYGFDDLIDLEQAAIGAANNKTVLPAALKKVKDHYAAQG
 KNFIISMAPEFPYLRTNGIYLDYINALEGYYDFIAPQYYNQQGGDGIWVDELNAWITQN
 NDAMKEDFLYYLTESLVTGTRGYAKIPAAKFVIGLPSNNDAAATGYVIDKQAVYNA
 FSRLDAKNLSIKGLMTWSINWDNGKSKAGVAYNWEFKTRYAPLIQGGVTPPPGKPN
 APTALVAELGATSLKLSWAAATGAFPIASYTVYRNGNPIGQTAGLSLADGGLTPAT
 QYSYFVTATDSQGNLSPSSALAVKTANDGTPPDGAPPEWQNNHSYKAGDVVSYKG
 KKYTCIQAHTSNAGWTPDAAFTLWQLIA.

Ek Şekil 7. *Serratia marcescens* Ha bakterisine ait *kitinaz C* geninin aa sırası (480)

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokulu 1990–1995 yılları arasında Trabzon Yüzüncü Yıl İlköğretim Okulu'nda, Ortaokulu 1995–1999 yılları arasında Trabzon Yunus Emre Anadolu Lisesi'nde ve liseyi 1999–2002 Trabzon Tevfik Serdar Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2003–2004 Eğitim–Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2007 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Yabancı dili orta derecede İngilizce'dir.

