

**FARKLI YÖNTEMLERLE KİTOSAN ELDESİ VE  
KARAKTERİZASYONU**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN  
BY DIFFERENT METHODS**

**İLKAY KOÇER**

**Prof. Dr. HÜLYA YAVUZ ERSAN**

**Tez Danışmanı**

**Yrd. Doç. Dr. EDA ÇELİK AKDUR**

**İkinci Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim Sınav Yönetmeliğinin  
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

2015

**İLKAY KOÇER**'in hazırladığı “Farklı Yöntemlerle Kitosan Eldesi ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tülin KUTSAL

Başkan

.....

Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN

Danışman

.....

Prof. Dr. Zümriye AKSU

Üye

.....

Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL

Üye

.....

Doç. Dr. Selim SANİN

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Canum aileme...*

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel, yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

23 / 01 / 2015

İLKAY KOÇER

## ÖZET

# FARKLI YÖNTEMLERLE KİTOSAN ELDESİ VE KARAKTERİZASYONU

**İLKAY KOÇER**

**Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya Yavuz Ersan**

**İkinci Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Eda Çelik Akdur**

**Ocak 2015, 80 sayfa**

Kitosanın endüstride geniş kullanım alanlarına sahip olmasından dolayı daha verimli ve daha iyi fizikokimyasal özellikteki kitosan üretimi için alternatif yollar bulmaya yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, farklı kaynaklardan ekstrakte edilen kitinden kitosan elde edilmiş ve ayrıca kitinin deasetilasyonunu katalizleyen kitin deasetilaz enziminin, rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında, kitin kaynağı olarak kerevit ve karides kabukları kullanılmıştır. Kitin ekstraksiyonunda farklı işlem sırasıyla ve farklı deasetilasyon koşullarıyla kitin ve kitosan üretim verimleri karşılaştırılmıştır. İşlem sırasının üretim verimini etkilemediği ancak otoklav kullanımının deasetilasyon verimini (%18) arttırdığı gözlemlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında, *Aspergillus niger* fungusundan kitin ve kitosan ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. *A. niger*'den elde edilen kitin ve kitosan verimlerine göre, bu fungusun kitin için daha uygun bir kaynak olduğu tespit edilmiştir.

Kabuklardan ve *A. niger*'den elde edilen kitinler ve bu kitinlerin kimyasal deasetilasyonu ile üretilen kitosanların FT-IR ve TGA ile karakterizasyonu yapılmıştır. FT-IR spektrumları, birbirleri ve literatür ile karşılaştırılarak absorpsiyon bantlarının örtüştüğü gözlenmiştir. *A. niger* küf mantarının hücre duvarından elde edilen kitosanın deasetilasyon derecesi en yüksek %74 olarak bulunmuştur. Elde edilen kitinden yola çıkılarak kimyasal yolla üretilen kitosanın deasetilasyon derecesi ise %86 olarak bulunmuştur. Kitin ve kitosanların TGA grafikleri karşılaştırıldığında, kitosanın termal stabilitesinin (250-270°C) kitine (350-400°C) göre düşük olduğu görülmüştür.

Çalışmanın son aşamasında, *Saccharomyces cerevisiae*'dan elde edilen kitin deasetilaz (*cda2*) geni ekspresyon vektörlerine klonlanıp, glikozilasyon genlerine sahip rekombinant *Escherichia coli* suşlarına aktarılmıştır. Sentezlenen plazmidler saflaştırılarak, restriksiyon analizi ve DNA dizilemesi ile doğrulanmıştır. Üretilen rekombinant enzimlerin aktiviteleri spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiş ve farklı ekspresyon sistemlerinden üretilen enzimler birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Aktivitede en iyi sonuç veren enzim (0.56 U/mL), ticari kitin ile inkübe edilmiş ve literatüre göre daha yüksek deasetilasyon oranı (%4.1) elde edilmiştir. Kitin deasetilaz geninin *E. coli*'ye klonlanmasıyla elde edilen rekombinant enzimin, doğal yapısına benzer bir yapıda üretimi ilk kez bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kitin, kitosan, deasetilasyon derecesi, *Aspergillus niger*, kitin deasetilaz, rekombinant

## **ABSTRACT**

# **SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN BY DIFFERENT METHODS**

**İLKAY KOÇER**

**Master of Philosophy, Department of Chemical Engineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Hülya Yavuz Ersan**

**Co-supervisor: Yrd. Doç. Dr. Eda Çelik Akdur**

**January 2015, 80 pages**

Studies have been increasing rapidly to find alternative ways for efficient production of chitosan with better physicochemical properties due to its broad range of applications in industry. In this study, chitosan was obtained from chitin which was extracted from different sources and also recombinant production of chitin deacetylase enzyme catalyzing the deacetylation of chitin was achieved.

In the first part of the study, crawfish and shrimp shells were used as chitin sources. Production yields of chitin and chitosan were compared for different procedures in chitin extraction process and different deacetylation conditions. It was observed that the order of steps did not affect the production yield whereas deacetylation under autoclaving conditions increased the efficiency (18%). In the second part of the work, chitin and chitosan extraction from *Aspergillus niger* fungus was performed. According to yields of chitin and chitosan, it was confirmed that this fungus is more favorable source for chitin rather than chitosan.

Chitins which were obtained from crustaceans and *A. niger*, and chitosans which were produced with chemical deacetylation of these chitins were characterized by

FT-IR and TGA. When the FT-IR spectra were compared, absorption bands of products matched up with each other and literature. The highest degree of deacetylation of chitosan which was extracted from cell wall of *A. niger* mold was obtained as 74%. At the same time, the highest degree of deacetylation of chitosan which was produced by chemical deacetylation of *A. niger* chitin was obtained as 86%. When TGA diagrams were compared, it was observed that the thermal stability of chitosan (250-270°C) was lower than that of chitin (350-400°C).

In the last part of the study, chitin deacetylase (*cda2*) gene derived from *Saccharomyces cerevisiae* was cloned into expression vectors and transferred into recombinant *Escherichia coli* strains which have glycosylation genes. The plasmids were verified by restriction analysis and DNA sequencing. Enzyme activities of recombinant enzymes were tested by a spectrophotometric assay and activities of enzymes which are produced from different expression systems were compared with each other. Enzyme which has the best activity (0.56 U/mL), was incubated with commercial chitin and a higher deacetylation rate (4.1%) than the literature value was obtained. The production of enzyme, which has a similar structure to the wild type, was achieved for the first time with this study, by cloning of chitin deacetylase (*cda2*) gene to *E. coli*.

**Keywords:** Chitin, chitosan, degree of deacetylation, *Aspergillus niger*, chitin deacetylase, recombinant



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda yardımcı olan, emeğini, zamanını ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, karşılaştığım tüm zorluklarda bana yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN'a;

Tez çalışmamın yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi birikimime çok şey katan, karşılaştığım tüm zorluklarda yanımda olup beni yüreklendiren, değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı, 013D11602002 ve 014D09602010 numaralı projeler kapsamında destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne sağladığı imkanlardan dolayı;

Çalışmamda sunulan özel analizlerin gerçekleştirilmesi için büyük özveri ve ilgi gösteren Belgin Arslan ve Duygu Gülay'a;

Her türlü imkanlarından yararlandığım Kimya Mühendisliği Bölümü ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Varlığıyla bana mutluluk veren, çekinmeden yardım isteyebildiğim canım hocam ve laboratuvar arkadaşım Özge Yüksel Orhan'a,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım sevgili laboratuvar arkadaşlarım, Ayça Şeker, Gamze İş, İrem Sıla Yağız, Selin Cansu Şen, Merve Özkutlu, Kourosh Salimi'ye ve çalışmalarım boyunca her türlü yardımına koşan Göksu Gür, Zehra Tatlı ve Emine Altun'a,

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, iyi ki birlikte çalışıyoruz dediğim değerli çalışma arkadaşlarıma,

İyi kötü her günümde yanımda olan, ömrüm boyunca dostluklarına hep ihtiyaç duyacağım değerli dostlarım Erek Ulutaş'a, Elif Sunal'a ve Ayça Betül Bingöl'e,

Başarımdaki manevi katkıları çok büyük olan, benimle birlikte gecelerini gündüzlerine katan, üzerimdeki haklarını kelimelerle ifade edemeyeceğim, hayatımdaki en büyük destekçilerim canım annem Ayşe Koçer'e, canım babam Turan Koçer'e, biricik abim İlker Koçer'e, sevgili eşi Selin Koçer'e ve ailemizin en tatlı üyesi İlkin Koçer'e,

**En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ÇİZELGELER .....	ix
ŞEKİLLER .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Kitin ve Kitosan .....	4
2.1.1. Kitin ve Kitosanın Özellikleri .....	5
2.1.2. Kitin ve Kitosanın Uygulama Alanları .....	7
2.2. Kitin ve Kitosan Kaynakları .....	8
2.3. Kabuklulardan Kitin Ekstraksiyonu .....	10
2.4. Mikroorganizmalardan Kitin ve Kitosan Ekstraksiyonu .....	12
2.5. Kitinden Kitosan Üretim Yöntemleri .....	14
2.5.1. Kimyasal Yöntem .....	14
2.5.2. Enzimatik Yöntem .....	16
2.6. Kitin Deasetilaz Enzimi .....	16
2.6.1. Fungus Kaynaklı Kitin Deasetilaz Enzimlerinin Özellikleri .....	19
2.6.2. Kitin Deasetilaz Enziminin Rekombinant Ekspresyon ile Üretilmesi .....	21
2.6.3. Kitin Deasetilaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi .....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	24
3.1. Materyaller .....	24
3.1.1. Kerevit ve Karides Kabuğu .....	24
3.1.2. Kimyasallar .....	24
3.1.3. Tamponlar ve Çözeltiler .....	24
3.1.4. Mikroorganizmalar, Çoğalma Ortamı ve Plazmidler .....	24
3.2. Kabuklulardan Kitin Eldesi .....	25
3.3. <i>Aspergillus niger</i> Küfünden Kitin ve Kitosan Eldesi .....	26
3.4. Genetik Mühendisliği Teknikleri .....	28

3.4.1. <i>E. coli</i> 'den Plazmid DNA'nın İzolasyonu.....	28
3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	28
3.4.3. DNA'nın Agaroz Jelden Ekstraksiyonu.....	28
3.4.4. Primer Tasarımı.....	30
3.4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	30
3.4.5.1. PCR Sonrası DNA'nın Saflaştırılması.....	31
3.4.6. DNA'nın Restriksiyon Enzimleri Kullanılarak Kesimi.....	31
3.4.6.1. Kesim Sonrasında DNA'nın Saflaştırılması.....	31
3.4.7. Ekleme Reaksiyonu (Ligasyon).....	32
3.4.8. <i>E. coli</i> 'nin CaCl <sub>2</sub> metodu ile Transformasyonu.....	32
3.4.9. DNA Dizi Analizlemesi.....	32
3.5. Kitin Deasetilaz Enzimi Üretimi.....	33
3.6. Kimyasal Yolla Kitinden Kitosan Üretimi.....	33
3.7. Enzim ile Kitinden Kitosan Üretimi.....	33
3.8. Analizler.....	34
3.8.1. Hücre Derişimi.....	34
3.8.2. DNA Derişimi.....	34
3.8.3. Enzim Aktivitesi.....	34
3.8.4. Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR).....	35
3.8.5. Termal Gravimetrik Analizler.....	38
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIşMA.....	39
4.1. Kerevit ve Karides Kabuklarından Kitosan Üretimi.....	39
4.1.1. Kerevit ve Karides Kabuğundan Kitin Ekstraksiyonu.....	39
4.1.2. Kimyasal Yolla Kitinden Kitosan Üretimi.....	42
4.1.2.1. FT-IR Analizi ve Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi.....	43
4.1.2.2. Termal Gravimetrik Analizler.....	46
4.2. <i>A. niger</i> 'den Kitin ve Kitosan Ekstraksiyonu.....	48
4.2.1. <i>A. niger</i> 'in oğaltılması.....	48
4.2.2. Kitin ve Kitosan Verimi.....	49
4.2.3. Kimyasal Yolla Kitinden Kitosan Üretimi.....	50
4.2.3.1. FT-IR Analizi ve Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi.....	50
4.2.3.2. Termal Gravimetrik Analizler.....	53
4.3. CDA Üretimi için Rekombinant <i>E.coli</i> Tasarımı.....	54
4.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile CDA2 Geninin oğaltılması.....	54

4.3.2. Vektörün Elde Edilmesi ve Ligasyon Tepkimesi .....	55
4.3.3. Klonların Restriksiyon Enzimleri ve DNA Dizi Analizi ile Kontrolü .....	56
4.4. Ekspresyon Çalışmaları.....	57
4.4.1. CDA Aktivitesi.....	59
4.4.2. Enzimatik Deasetilasyon Çalışmaları .....	61
5. SONUÇLAR .....	63
KAYNAKLAR.....	67
EKLER .....	77
ÖZGEÇMİŞ .....	80

## ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Yapısal parametreler ve özellikleri arasındaki ilişki.....	7
Çizelge 2.2. Kitosanın bazı kullanım alanları ve uygulamaları .....	8
Çizelge 2.3. Kitin ve kitosanın biyosferdeki bazı kaynakları .....	9
Çizelge 2.4. Farklı funguslardan elde edilen kitin deasetilazların özellikleri .....	20
Çizelge 2.5. Kitin deasetilazın heterojen ekspresyonu için seçilen gen kaynakları ve konak hücreler.....	21
Çizelge 3.1. <i>Aspergillus niger</i> için besi ortamı.....	24
Çizelge 3.2. LB ortamı bileşeni.....	25
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerler .....	30
Çizelge 3.4. PCR reaksiyon parametreleri.....	31
Çizelge 3.5. Glukozamin-HCl standartının tüplere dağılımı .....	35
Çizelge 3.6. DD hesaplamasında kullanılan absorpsiyon bantları.....	36
Çizelge 3.7. DD hesaplamasında kullanılan FT-IR eşitlikleri .....	36
Çizelge 4.1. Deasetilasyon koşullarına göre elde edilen kitosan miktarları ve verimi .....	42
Çizelge 4.2. FT-IR analizi ile hesaplanan deasetilasyon dereceleri.....	46

## ŞEKİLLER

### Sayfa

Şekil 2.1. Selüloz ve kitinin kimyasal yapıları .....	4
Şekil 2.2. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları .....	5
Şekil 2.3. Kabuklu canlıların atıklarından kitin ekstraksiyonuna ait akış şeması... 10	
Şekil 2.4. Kitin deasetilaz enziminin katalitik reaksiyonu .....	17
Şekil 2.5. <i>M. rouxi</i> 'den elde edilen kitin deasetilaz enziminin kitin oligomerleri üzerindeki etki mekanizması .....	19
Şekil 2.6. Glikozilasyon enzimlerini kodlayan plazmid sayesinde <i>E. coli</i> bakterisinin gliko-protein yapısında protein üretebilmesini sağlayan pgl lokusunun şematik gösterimi.....	23
Şekil 3.1. Kitin ve kitosan eldesi akış şeması .....	27
Şekil 3.2. Klonlama prosedürünün şematik gösterimi .....	29
Şekil 3.3. Deasetilasyon derecesi hesaplamalarında kullanılan taban çizgileri (baselines).....	37
Şekil 4.1. Kerevit kabuğuna uygulanan işlemler sonucunda elde edilen miktarlar (A). İşlem sırası: DP-DP-DM; (B). İşlem sırası: DP-DM-DP .....	40
Şekil 4.2. Karides kabuğuna uygulanan işlemler sonucunda elde edilen miktarlar (A). İşlem sırası: DP-DM; (B). İşlem sırası: DM-DP .....	41
Şekil 4.3. Kitin ekstraksiyonu aşamalarında elde edilen FT-IR spektrumları.....	43
Şekil 4.4. Elde edilen kitinlerin FT-IR spektrumları (A: Ticari kitin; B: Kerevit kitin I; C: Kerevit kitin II; D: Karides kitin I; E: Karides kitin II) .....	44
Şekil 4.5. Elde edilen kitosanların FT-IR spektrumları (A: Ticari kitosan; B: Kerevit kitosan I; C: Kerevit kitosan II; D: Karides kitosan I; E: Karides kitosan II) .....	45
Şekil 4.6. Termal gravimetrik analiz sonuçları (A: karides kitin; B: kerevit kitosan; C: karides kitosan) .....	47
Şekil 4.7. <i>A. niger</i> 'in 3. gün sonunda çoğalması .....	49
Şekil 4.8. <i>A. niger</i> 'in 8. gün sonunda çoğalması .....	49
Şekil 4.9. <i>Aspergillus niger</i> biyokütlesine uygulanan işlemler sonucunda elde edilen miktarlar.....	50
Şekil 4.10. <i>A. niger</i> fungusundan elde edilen kitosanın FT-IR analizi (A:Ticari kitosan; B: 1 M NaOH ile muamele - 121°C, 20 dak; C: 1 M NaOH ile muamele - 90°C 2 saat).....	51

Şekil 4.11. <i>A. niger</i> 'den elde edilen kitin ve kimyasal deasetilasyonla elde edilen kitosanın FT-IR spektrumları (A: Ticari kitin; B: <i>A. niger</i> kitin; C: Ticari kitosan; D: <i>A. niger</i> kitininin kimyasal deasetilasyonu ile elde edilen kitosan) .....	52
Şekil 4.12. Termal gravimetrik analiz sonuçları (A: <i>A. niger</i> kitosan; B: Kimyasal deasetillenmiş <i>A. niger</i> kitin).....	53
Şekil 4.13. CDA2 geninin agaroz jel elektroforezde görünümü. ....	55
Şekil 4.14. pTrc99A vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonraki agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	56
Şekil 4.15. Restriksiyon enzimleri ile kesilen rekombinant plazmidlerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	57
Şekil 4.16. Farklı ekspresyon vektörleri taşıyan <i>E. coli</i> BL21 (DE3) suşlarının, hücre derişimlerinin zamanla değişimi.....	58
Şekil 4.17. Farklı ekspresyon vektörleri taşıyan <i>E. coli</i> CLM24 suşlarının, hücre derişimlerinin zamanla değişimi.....	59
Şekil 4.18. Farklı plazmidler taşıyan <i>E. coli</i> 'lerin 25 ml besi yerinde yapılan üretim ile elde edilen CDA aktiviteleri .....	60
Şekil 4.19. Farklı seyreltme oranlarına sahip <i>E. coli</i> 'lerin CDA aktivitelerinin kıyaslanması .....	61
Şekil 4.20. Enzimatik deasetilasyona ait FT-IR spektrumu.....	62

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

bç	Baz çifti
°C	Santigrat derece
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
CH <sub>3</sub> COOH	Asetik asit
dH <sub>2</sub> O	Distile su
FeCl <sub>3</sub>	Ferri klorür
g	Gram
g/l	gram/litre
HCl	Hidroklorik asit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
kb	Kilo baz
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilo dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum dihidrojen fosfat
KHSO <sub>4</sub>	Potasyum hidrojen sülfat
M	Molar
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Magnezyum sülfat heptahidrat
NaNO <sub>2</sub>	Sodyum nitrit
NaNO <sub>3</sub>	Sodyum nitrat
N <sub>2</sub> H <sub>6</sub> SO <sub>3</sub>	Amonyum sülfamat
NaOH	Sodyum hidroksit
Rpm	Devir/dakika
T <sub>m</sub>	Erime Sıcaklığı
U	Ünite
v/v	hacim/hacim
w/v	kütle/hacim

### Kısaltmalar

Amp	Ampisilin
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>



ATR	Azalan tam yansıma
C	Sitozin
CDA	Kitin deasetilaz
Cm	Kloramfenikol
DA	Asetilasyon derecesi
Dak	Dakika
DD	Deasetilasyon derecesi
DNA	Deksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosit trifosfat
DP	Polimerizasyon derecesi
EB	Elüsyon tamponu
EC	Enzim Komisyonu
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FT-IR	Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi
G	Guanin
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
Kan	Kanamisin
LB	Luria Bertani
MA	Molekül ağırlığı
MBTH	3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OD	Optik yoğunluk
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pgl	Protein glikozilasyon gen bölgesi
SOB	Super Optimal Broth
St	Saat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGA	Termal gravimetrik analiz
Tp	Trimetoprim

# 1. GİRİŞ

Kitin, N-asetil-D-glukozamin birimlerinden oluşan, selülozdan sonra doğada en çok bulunan, kolay elde edilebilir ve yenilenebilir bir biyopolimer olup; kabuklu su canlılarında, böceklerde ve belirli funguslarda bulunmaktadır [1]. Ancak, organik ve sulu çözücülerde çözünmemesinden dolayı endüstriyel kullanımı sınırlıdır [2]. Kitinin molekül zincirindeki N-asetil-D-glukozamin birimlerinin, D-glukozamin birimlerine dönüştürülmesi (deasetilasyon) işlemi ile, en önemli türevlerinden biri olan kitosan elde edilmektedir. Kitosanı kitinden ayıran temel parametre, içerdiği D-glukozamin monomerlerinin mol yüzdesi olarak tanımlanan, deasetilasyon derecesidir ve en az %60 deasetilasyon derecesine sahip kitin, kitosan olarak kabul edilmektedir [3].

Biyobozunur ve biyouyumluluk özelliklerine sahip, toksik olmayan ve kitinden farklı olarak asidik çözücülerde çözünen kitosan, son yıllarda popüleritesi ve ekonomik değeri yüksek polimerler arasında yer almaktadır. Kitosan bu özellikleriyle, medikal, gıda, atık su arıtımı ve ziraat gibi birçok alanda uygulamaya sahiptir [2].

Günümüzde ticari kitosan üretimi, yaygın olarak kabuklu atıklarından ekstrakte edilen kitinden gerçekleştirilmektedir. Ancak bu kitin kaynağının, temininde sezonluk kısıtlamaların olması, kabukların yapılarındaki proteinlerden kaynaklanan alerji riskleri gibi birtakım dezavantajları bulunmaktadır [4]. Bu kısıtlamaları ortadan kaldırmak için, hızla gelişen fermantasyon teknolojisi ile mikroorganizmaların geniş ölçekli çoğaltılmasının sağlanmasıyla, hücre duvarlarında kitin ve kitosan içeren fungusların alternatif kaynaklar olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Funguslar, basit nütrient ortamlarında kolaylıkla çoğalabilme özelliklerinden dolayı ucuz ve sınırsız bir kaynak olması, çok düşük miktarlarda mineral içerdikleri için, ekstraksiyon sırasında kabuklularda yapılan demineralizasyon işlemine gerek olmaması gibi avantajlara sahiptir [5, 6]. Ayrıca yapılarında bulunan kitosanın, molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi, viskosite gibi fizikokimyasal özellikleri fermentasyon koşullarında değişiklikler yapılarak kontrol altına alınabilmektedir [4].

Kitinin kitosana dönüşümü, genel olarak kitine termokimyasal işlem uygulanmasıyla gerçekleştirilmektedir. Kimyasal deasetilasyonda yüksek deasetilasyon derecelerinde kitosan elde edilebilmektedir ancak bu yöntem, yüksek sıcaklıklarda kuvvetli alkali çözücülerin harcanmasından dolayı çevre açısından uygun değildir,

kontrol edilmesi zordur ve depolimerizasyondan dolayı heterojen ürün dağılımı elde edilmektedir [7]. Deasetilasyon işlemi, ayrıca kitin deasetilaz enzimi (EC 3.5.1.41) kullanılarak da gerçekleştirilebilmektedir ve bu yöntem kimyasal metottaki birçok dezavantajı ortadan kaldırmaktadır.

Kitin deasetilaz enzimi, kitindeki monomerik asetil glukozamin birimlerinin deasetilasyonunu katalizlemektedir. Karbonhidrat esteraz 4 ailesi (CE4) üyelerinden biridir ve glikoprotein yapıdadır [8]. Literatürde, *Mucor rouxii* [9], *Absidia coerulea* [10], *Aspergillus nidulans* [11] ve *Saccharomyces cerevisiae* [12] gibi fungus ve mayalardan elde edilen kitin deasetilaz enzimleri ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bunlara ek olarak son zamanlarda kitin deasetilaz enziminin verimini ve aktivitesini artırmaya yönelik rekombinant enzim üretme çalışmaları da yapılmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, konakçı hücre olarak *Escherichia coli* [13, 14] ve *Pichia pastoris* [15, 16] ile çalışılmıştır. Ancak enzimin doğal yapısına benzer bir yapıda yani glikoprotein olarak üretimi gerçekleştirilememiş ve bu durumda yeterli enzim aktivitesi görülememiştir. Bununla birlikte glikozilasyon mekanizmalarının bakterilerde varlığı yakın zamanda keşfedilmiş [17] ve *Campylobacter jejuni* bakterisinde bulunan basit bir protein glikozilasyon gen bölgesi (pgl), *E. coli* bakterisine aktarılarak, bu bakteriye proteinleri glikozilleme yeteneği kazandırmıştır [18]. Dolayısıyla *E. coli*'de glikoprotein üretimi, henüz çok yeni bir kavramdır ve glikoprotein yapısındaki kitin deasetilazın bakterilerde üretimine dair bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Kitin ve kitosan hakkındaki ilk kapsamlı yayın, 1977 yılında Muzarelli tarafından yapılmış olup [19], bu çok yönlü polimerlerin alternatif kaynaklar kullanılarak daha verimli üretilmesi, yeni uygulama alanlarının bulunması ve uygulanmasına yönelik çalışmalar halen kapsamlı ve yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bu tez çalışmasının amacı, farklı kaynaklardan ekstrakte edilen kitinden kitosan elde etmek ve kitinin enzimatik deasetilasyonu için kitin deasetilaz enziminin rekombinant üretimini gerçekleştirmektir. Bu kapsamda kitin kaynağı olarak kerevit, karides ve *Aspergillus niger* fungusu kullanılmış ve bu kaynaklardan elde edilen kitin ve kitosanların FT-IR ve TGA ile karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca kimyasal yolla üretilen kitosanların, FT-IR absorbanslarının kullanıldığı eşitlikler yardımıyla deasetilasyon dereceleri hesaplanmıştır. Tez çalışmasının enzimatik kısmında ise, *Saccharomyces cerevisiae*'dan elde edilen kitin deasetilaz (*cda2*) geni pTRc99A ve

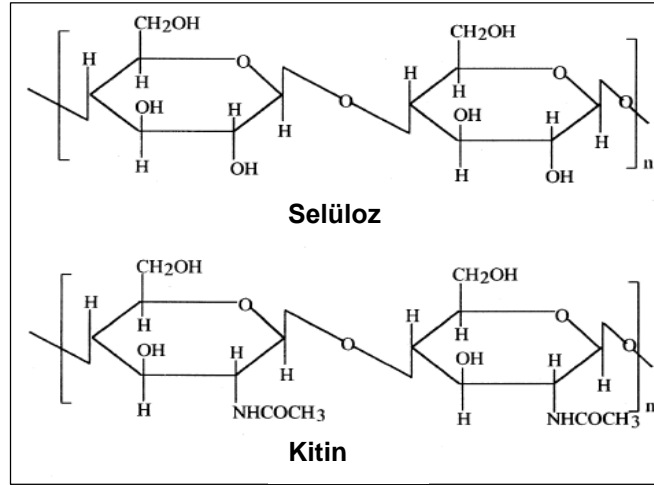
pET28a ekspresyon vektörlerine klonlanıp, glikozilasyon genlerine sahip rekombinant *Escherichia coli* suşlarına aktarılmıştır. Sentezlenen plazmidler saflaştırılarak, restriksiyon analizi ve DNA dizilemesi ile doğrulanmıştır. Üretilen rekombinant enzimlerin aktiviteleri spektrofotometrik yöntem ile tayin edilmiş ve farklı ekspresyon sistemlerinden üretilen enzimler birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Son kısımda ise, aktivitede en iyi sonuç veren enzimin ticari kitin ile enzimatik deasetilasyonu çalışılmış ve FT-IR ile analiz edilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kitin ve Kitosan

Kitin, selülozdan sonra doğada en çok bulunan ikinci biyopolimerdir. Canlı organizmalar tarafından yılda en az 10 gigaton ( $10^{13}$  kg) kitin üretilmektedir [20]. Omurgasızların, kabukluların, böceklerin dış iskeleti ve küf ile mayanın hücre duvarının temel maddesi olup, koruyucu ve destekleyici bileşen olarak görev alır [21].

Kitin ilk olarak 1811 yılında Fransız bilim adamı Henri Braconnot tarafından mantardan izole edilmiş ve keşfedilmiştir. Daha sonra 1823 yılında Odier, aynı yapıyı böceklerin kabuklarında bulmuştur ve Yunanca kökenli olan kitin ismi Odier tarafından verilmiştir [22]. Kitin, 2-asetamido-2-deoksi- $\beta$ -D-glukoz (N-asetil-D-glukozamin) monomerlerinden oluşan polisakaritlerden biri olup, poli- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-asetamido-2-deoksi-D-glukoz olarak da adlandırılır. Yapısal olarak selüloze benzemektedir (Şekil 2.1). Karbondaki hidroksil grubu, bir asetamido grubuyla yer değiştirmiş selüloz olarak da kabul edilebilir [23].

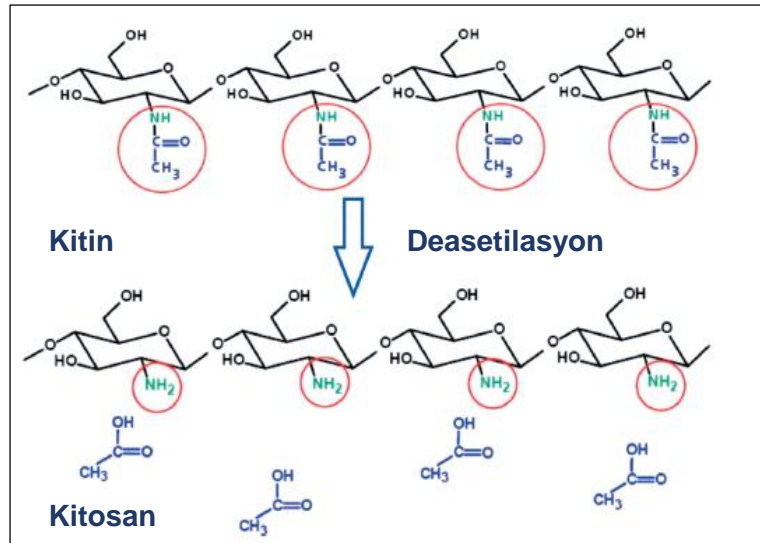


Şekil 2.1. Selüloz ve kitinin kimyasal yapıları [23]

Kitosan, 1859 yılında Rouget tarafından içerisinde kitin bulunan derişik KOH çözeltisini kaynatırken keşfedilmiştir [22]. Kitosan, kitinin alkali ya da enzimatik deasetilasyonu (asetil gruplarının uzaklaştırılması) ile elde edilen en önemli ürünlerinden biridir. Deasetilasyon prosesi, kitinin molekül zincirindeki N-asetil-D-glukozamin birimlerinin D-glukozamin birimlerine dönüştürülmesi işlemidir. Asetilasyon (DA) ve deasetilasyon dereceleri (DD) sırasıyla kitosan molekülündeki

N-asetil-D-glukozamin ve D-glukozamin monomerlerinin mol yüzdesinin bir ifadesidir. Deasetilasyon derecesi, 0 (kitin) ile 100 (tamamen deasetillenmiş kitin) arasında değişmektedir. Kitin ve kitosan birbirinden deasetilasyon derecesi ile ayrılmaktadır ve genellikle %60 ve üzeri deasetilasyon derecelerindeki kitin, kitosan olarak kabul edilmektedir [3]. Kitosanın deasetilasyon derecesinin belirlenmesinde ninhidrin testi, lineer potansiyometrik titrasyon, kızılötesi (IR) spektroskopisi, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi, HBr titrasyonu gibi yöntemler kullanılmaktadır [24].

Kitosan, katyonik bir polisakkarittir ve  $\beta$ - (1,4)- 2-asetoamido-2-deoksi-D-glukoz ve  $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz ünitelerinin bir kopolimeridir. Kitin ile kitosan arasındaki tek fark, kitinde C-2 pozisyonundaki (ikinci karbon atomu) asetamido (-NHCOCH<sub>3</sub>) grubu yerine, kitosanda amin (-NH<sub>2</sub>) grubunun bulunmasıdır (Şekil 2.2). Bu durumda kitosan, her tekrarlayan birimdeki primer (C-6) ve sekonder (C-3) hidroksil grupları ile amin (C-2) grubu olmak üzere toplam üç tane reaktif gruba sahiptir. Bu reaktif gruplar kolayca kimyasal modifikasyona uğrayabilmekte ve kitosanın mekaniksel ve fiziksel özellikleri ile çözünürlüğünü değiştirmektedir [25].



**Şekil 2.2.** Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları [26]

### 2.1.1. Kitin ve Kitosanın Özellikleri

Kitin ve kitosan, yapılarında yüksek azot oranına sahip olmaları sebebiyle, diğer biyopolimerlere göre ticari açıdan daha çok ilgi görmektedir. Kitindeki azot miktarı, deasetilasyon derecesine bağlı olarak %5-8 arasında değişmektedir. Kitosandaki azot ise çoğunlukla primer alifatik amino gruplar (-NH<sub>2</sub>) şeklindedir ve bu grupların

bulunması kitosanı kimyasal modifikasyon için uygun hale getirir. Kitosan bu özelliğiyle aminlere özgü reaksiyonlar verir ve bunların en önemlileri N-açilasyon ve Schiff bazı reaksiyonlarıdır. Asit anhidritler ile ya da açıl halojenürlerle gerçekleştirilen N-açilasyon reaksiyonunda, kitosan azotunda amido grupları oluşturur. Asetik anhidrit tamamen asetillenmiş kitin meydana getirir [23]. Kitosan çok yönlü bir biyopolimerdir; uygulama alanlarına göre toz, nanopartikül, jel boncuk, fiber ve membran gibi farklı şekilde polimer formlarına kolaylıkla dönüştürülebilir [27].

Kitin ve kitosan toksik değildir, biyouyumlu ve biyobozunurdur. Asit giderici, antiülser, antitümör, antimikrobiyal, antioksidant, antibakteriyel ve antifungal etki gibi biyoetkileri vardır [28]. Kitin ve kitosan arasındaki en belirgin farklılık, çözünürlük özellikleridir. Kitin oldukça hidrofobiktir ve içerdiği güçlü hidrojen bağlarından dolayı sık kullanılan çözücülerde çözünmez. Mineral asitlerin seyreltik çözeltileriyle konjuge olan hekzafloroizopropanol, hekzafloroaseton ve kloroalkoller ile %5-8 lityum klorür içeren dimetilasetamit gibi toksik özelliği yüksek çözücülerde çözünür [29]. Bu özellik, kitinin endüstriyel uygulamalarda kullanımını önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Kitosan ise herhangi bir organik çözücüde ya da suda çözünmemektedir ancak asidik ortamda ( $\text{pH} < 6$ ) amino gruplarının protonasyona uğraması sonucunda suda çözünebilir bir özellik kazanır [28]. Kitosan, asetik asit, formik asit, laktik asit, okzalik asit gibi organik asitler ile hidroklorik asit, nitrik asit gibi bazı mineral asitlerde çözünür fakat fosforik asit ve sülfirik asiti çözücü olarak kullanmak uygun değildir [30, 31]. Kitosanın sahip olduğu amino gruplarının çözünme sırasında protonlanmasından dolayı kitosan, pozitif yüklenmiş olur. Bu özellik, kitosanın katyonik bir polisakkarit olduğunu göstermektedir [28, 32]. Bu özelliğinden dolayı, negatif yüklü polimerlerle, makromoleküllerle ve polianyonlarla etkileşme yeteneğine sahiptir. Bunun yanında, su ve yağ bağlama kapasitesi oldukça yüksektir ve çok iyi film oluşturma özelliğine sahiptir [23].

Biyosferdeki kitinin molekül ağırlığı genellikle 1000 kDa'dan daha büyük iken [33], ticari kitosanın molekül ağırlığı, kitin kaynağına ve üretim prosesine bağlı olarak değişiklik göstermektedir [34]. Sigma-Aldrich tarafından satılan ticari kitosan, yüksek ve düşük molekül ağırlıklı olmak üzere iki kalitede mevcuttur. Düşük molekül ağırlıklı kitosanın molekül ağırlığı 20-190 kDa arasında olup, deasetilasyon derecesi

%75 civarındır. Yüksek molekül ağırlıklı kitosan ise 190-375 kDa molekül ağırlığıyla ve %75'ten büyük deasetilasyon derecesiyle karakterize edilmektedir [32].

Kitosanı karakterize eden fizikokimyasal özellikleri; deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı, viskozite ve çözünürlüktür. Deasetilasyon derecesi, kitosan için en önemli yapısal parametrelerden birisi olup; molekül ağırlığı, çözünürlük, viskozite gibi fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra biyobozunurluğu ve immünolojik aktiviteyi de etkiler [35] (Çizelge 2.1). Kitosan kristalin bir yapıdadır ve kristallik derecesi kitin (%0 deasetillenmiş) ve tamamen deasetillenmiş kitin (%100 deasetillenmiş) için maksimumdur [2].

**Çizelge 2.1.** Yapısal parametreler ve özellikleri arasındaki ilişki

Özellik	Yapısal Parametre	Kaynak
Çözünürlük	↑ DD	[36, 37]
Kristalinite	↓ DD	[2]
Biyobozunurluk	↓ DD ↓ MA	[38, 39]
Viskozite	↑ DD	[39]
Biyoyumluluk	↑ DD	[2]
Antimikrobiyal	↑ DD ↑ MA	[40]

\* ↑ - Özelliği doğru yönde etkiler; ↓ - Özelliği ters yönde etkiler.

\*\* DD: Deasetilasyon derecesi; MA: Molekül ağırlığı

### 2.1.2. Kitin ve Kitosanın Uygulama Alanları

Kitin, kitosan ve türevleri, medikal ve gıda başta olmak üzere atık su arıtımı, ziraat, kozmetik gibi çeşitli alanlarda kullanım yeri bulmuştur (Çizelge 2.2). Yapısında bulundurduğu fonksiyonel gruplar ve katyonik polimer olma avantajları ile kitosan, biyobozunur film ve fiberlerin, katkı maddelerinin [41], antimikrobiyal koruyucuların [42] ve nanopartiküllerin üretiminde ve diğer çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır [43, 44]. Ayrıca, enzim immobilizasyonunda [45], kromatografide [46] ve atık su arıtımında çöktürücü ve şelatlama ajanı olarak [47, 48] kullanım alanına sahiptir.

Çizelge 2.2'de görüldüğü gibi kitin ve kitosan çok farklı alanlarda kullanım yeri bulmuştur. Son zamanlarda da kitosan temelli yara örtüleri üzerine çalışmalar artmaktadır [49]. Kitosan tabletleri ve/veya fiberleri diyet ürünü olarak kullanılabilen ve yağların vücutta metabolize olmadan dışarı atılmasını sağlamaktadır. Bu özelliği ile aynı zamanda kolesterol seviyesini de düşürdüğü görülmüştür. Kitosanın kozmetik alanında kullanımı özellikle saç bakımı konusunda yoğunlaşmıştır. Kozmetik uygulamalar için organik asitler genellikle iyi çözücülerdir



ve kitosan asit ile nötralize olduğunda viskoz hale geçen tek doğal katyonik reçinedir. Bu materyaller krem, losyon ve kalıcı dalgalandırıcı losyonlarda kullanılmaktadır [23].

**Çizelge 2.2.** Kitosanın bazı kullanım alanları ve uygulamaları

<b>Kullanım Alanı</b>	<b>Uygulamaları</b>	<b>Kaynak</b>
Gıda	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Doğal kıvamlaştırıcı</li> <li>• Hayvan yemlerini de içeren yiyecek katkı maddesi</li> <li>• Filtreleme ve temizleme</li> <li>• Boyar maddenin uzaklaştırılması</li> </ul>	[48, 50]
Medikal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yara bandı</li> <li>• İlaç salım sistemleri</li> <li>• Diş uygulamaları</li> <li>• Pıhtılaşma etkeni</li> <li>• Cerrahi uygulamalar</li> </ul>	[44, 51]
Biyoteknoloji	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzim immobilizasyonu</li> <li>• Hücre geri kazanımı</li> <li>• Kromatografi</li> <li>• Protein saflaştırma</li> </ul>	[45, 50]
Kozmetik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nemlendirici</li> <li>• Saç ve cilt bakımı</li> <li>• Banyo losyonu</li> </ul>	[50, 52]
Atık su arıtımı	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metal iyonların, radyoaktif bileşiklerin ve boyaların uzaklaştırılması</li> <li>• Koagülasyon ve flokülasyon</li> </ul>	[21, 50, 53, 54]
Ziraat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bitki tohumu kaplanması</li> <li>• Gübre yapımı</li> <li>• Fungusit</li> </ul>	[6, 50, 52]

## **2.2. Kitin ve Kitosan Kaynakları**

Kitin, biyosferde kabuklu canlılarda, böceklerde ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Çizelge 2.3). Kitin mikrofibrillerinin alfa, beta ve gamma olmak üzere üç farklı yapısı vardır. Alfa yapısı doğada en fazla bulunan formudur ve antiparalel zincir yapısına sahiptir. Kabuklu su canlılarının kabuklarında, küflerin hücre duvarlarında, mayalarda ve böceklerde bulunmaktadır. Beta formu paralel zincir yapısına sahiptir ve doğada daha az görülmekte olup mürekkep balığının kollarında

bulunur. Gamma formu ise paralel ve antiparalel yapıların karışımı olarak böceklerin kozalarında görülür [55].

**Çizelge 2.3.** Kitin ve kitosanın biyosferdeki bazı kaynakları [56]

<b>Su Canlıları</b>	<b>Böcekler</b>	<b>Mikroorganizmalar</b>
Halkalı solucanlar Yumuşakçalar Deniz Omurgasızları Kabuklular: Yengeç Karides İstakoz Kerevit	Akrepler Örümcekler Kolsu Ayaklılar Karıncalar Hamam Böceği Arılar	Yeşil alg Kahverengi alg Maya Mantar (küf) <i>Penicillium</i> miselleri <i>Ascomydes</i>

Kitinin en iyi kaynakları içerisinde deniz kabukluları (karides, yengeç, istakoz), kerevit (tatlı su istakozu), mürekkep balığı ve istiridye bulunmaktadır. Bir kabuklunun %25'i katı, %20-25'i yenilebilir kısım ve %50-60'ı da işlenebilir atık olarak belirlenmiştir [57]. Kabuklu atıkları, kitinin endüstriyel proseslerinde halen en büyük kaynaktır ve yılda 1.44 milyon metrik ton kuru ağırlığında işlenebilir atık üretilmektedir [58]. Kabukluların kabuğu, ağırlıklı olarak %30-40 proteinler, %30-50 mineral tuzlar, %13-42 arası kitin [59], az miktarda Na, P, Mg gibi diğer mineralleri ve kabuklara rengini veren karotenoidleri (özellikle astaksantin) içermektedir [60] ve bu içeriğin miktarları, proses sırasındaki kabuk soyma koşullarına, türlere, organizmanın kısımlarına, beslenme durumlarına ve yaşam döngülerinin evresine bağlı olarak değişmektedir [61]. Atıklardaki protein içeriğini bağ dokuları, kitin ve mineral tuzlarla oluşturduğu dış iskeleti oluşturan kompleks yapılar ve etlerden kalan kısımlar oluşturmaktadır. Kabuktaki mineral oranı çoğunlukla kalsiyum ve magnezyumun fosfatları ve karbonatları olarak bulunmaktadır.

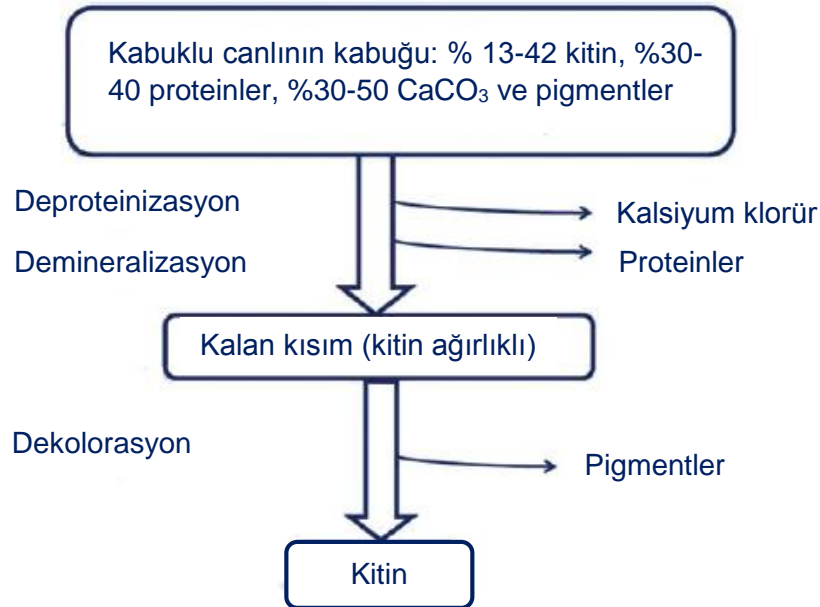
Kitin fungusların hücre duvarının sağlamlığı için önemli bir bileşendir. Mayaların kuru hücre ağırlığının sadece %1-2'sini oluştururken [62], küf mantarlarında kuru ağırlığın %40-45'i olarak değişmektedir [63]. Kitinden ayrı olarak, misel kalıplarının hücre duvarları önemli miktarlarda kitosan ve çeşitli asidik polisakkaritler içermektedir. *Mucor rouxii* [64], *Absidia glauca* [65], *Aspergillus niger* [66, 67], *Gongronella butleri* [4, 68], *Pleurotus sajor-caju* [66], *Rhizopus oryzae* [66, 67], *Lentinus edodes* [69] ve *Trichoderma reesei* [70] gibi fungusların miselyumları kitin ve kitosan kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Günümüzde mikroorganizmalar kitin ve kitosanın endüstriyel ölçekli üretiminde kullanılmamasalar da, bu kaynaktan kitin ve kitosan üretimi için çeşitli yöntemler denenmiş ve geliştirilmiştir [5, 66]. Küf ve mayaların hücre duvarlarından kitin ve kitosanın elde edilip kullanılması, kolay elde edilebilmesi açısından avantajlıdır. Son zamanlarda da mikroorganizmaların sitrik asit, enzim, vitamin, antibiyotik ve hormonların endüstriyel üretiminde kullanımlarının artması sonucu, küf misellerinin ve mikrobiyal hücrelerin elde edilebilmesi daha da kolaylaşmıştır. Kitin ve kitosan içeriğine sahip mikroorganizmalar yüksek çoğalma hızına sahiptir ve optimum kültivasyon koşullarında ikileme süreleri 1 ile 3 saat arasında değişmektedir. Ayrıca küfler, kağıt ve gıda sanayinin yan ürünü olan selüloz gibi substratlarda büyüebildiği için ucuz bir kaynaktır [61].

### 2.3. Kabuklulardan Kitin Ekstraksiyonu

Kabuklu canlılardan kitosan üretimi genel olarak iki temel kısma ayrılır. İlk kısımda çeşitli işlemler ile kabuklardan kitinin ekstraksiyonu, ikinci kısımda ise kitindeki asetil gruplarının uzaklaştırılması ile kitosanın elde edilmesi yer almaktadır.

Kitinin izolasyonu, kabukta bulunan diğer maddelerin uzaklaştırılması ile gerçekleştirilir ve bunun için yapılan işlemler üç ana basamak altında toplanabilir: (i) Deproteinizasyon (proteinlerin uzaklaştırılması); (ii) Demineralizasyon (minerallerin uzaklaştırılması); (iii) Dekolorasyon (pigmentlerin uzaklaştırılması). Kitin ekstraksiyonuna ait proses akış şeması Şekil 2.3' te gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Kabuklu canlıların atıklarından kitin ekstraksiyonuna ait akış şeması [26]

Kabuklu canlılarda kitin ile proteinler, protein-kitin matrisini oluşturmak için birleşirler ve bu yapı daha sonra mineral tuzlarla mekanik dayanıklılığa sahip kabukları oluşturur. Kabuklardan kitin elde etmek için proteinlerin ve minerallerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Deproteinizasyon işleminde proteinlerin bir kısmı kolayca ekstrakte edilebilmekte iken geri kalan kısım, kitinle kuvvetli kovalent bağ ile bağlandıklarından dolayı hemen ekstrakte edilemez. Bu aşamada proteinleri çözmek için kabuk artıkları %1-10 (w/v) konsantrasyonunda seyreltik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile 65-100°C'de muamele edilir [61]. İşlemin süresi, hazırlama yöntemine bağlı olarak 0.5-72 saat arasında değişmektedir [60].

Demineralizasyon işlemi genellikle hidroklorik asit (HCl), nitrik asit (HNO<sub>3</sub>), asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH) ve formik asit (HCOOH) gibi asit çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmekte olup [71, 72], bu asitler içerisinde en çok, hidroklorik asit tercih edilmektedir [73]. Burada seyreltik hidroklorik asit çözeltisi kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilen işlem sonucunda, kabuklarda bulunan kalsiyum karbonat, kalsiyum klorüre dönüşerek çözülür ve uzaklaştırılır.

Deproteinize ve demineralize edilmiş kitin, pigmentlerin varlığından dolayı açık pembe renktedir. Dekolorasyon sırasında kullanılacak kimyasalın, kitin ve kitosanın fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini etkilemeyecek bir madde olması gerekmektedir. Bu amaçla, pigmentlerin uzaklaştırılması için 60°C'de %0,02 (w/v) potasyum permanganat (KMnO<sub>4</sub>) çözeltisi, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) veya sodyum hipoklorit (NaClO) kullanılmaktadır [73].

Literatürde kabuklulardan kitin/kitosan üretimi ile ilgili çeşitli çalışmalar yer almaktadır ve yapılan çalışmalarda seçilen kitin kaynağına bağlı olarak uygulanan demineralizasyon ve deproteinizasyon basamaklarının sırası, kullanılan alkali ve asidik çözeltilerin derişimleri, reaksiyon süresi ve sıcaklıkları farklılık göstermektedir [60, 74, 75]. Örneğin, kerevit kabuğu atıklarının kullanıldığı bir çalışmada deproteinizasyon işlemi %3.5'lük (w/v) NaOH (65°C'de 2 saat) çözeltisi kullanılarak, demineralizasyon işlemi de 30 dakika boyunca oda sıcaklığında 1 M HCl çözeltisi ile muamele edilerek gerçekleştirilmiştir. Kabuk matrisinden karotenoidi uzaklaştırmak için 5 dakika %0.315'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ile renk giderimi yapılmadan önce aseton ile ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır [76]. Tolaimate ve arkadaşları tarafından yapılan kitin kaynağı olarak karidesin kullanıldığı başka bir çalışmada ise deproteinizasyon (0.3 M NaOH, 80-85°C, 1 saat) ve demineralizasyon

(0.55 M HCl, oda sıcaklığı, 15-60 dakika) işlemleri çok basamaklı olarak aynı koşullarda üçer defa tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin tek basamaklı olana göre çok daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmada ayrıca dekolorasyon işlemi için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit)/HCl karışımı kullanılmıştır [60].

Kabuklu atıklarından kitin elde etmek için yaygın olarak kullanılan ve yukarıda bahsedilen kimyasal ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan kimyasalların geri dönüşümü yapılamadığından çevre için tehlike oluşturmaktadır [77]. Ayrıca, kitinin kimyasal ekstraksiyonu sırasında kabuktaki yararlı proteinler zarar görebilir ve bu proteinlerin hayvan yemi gibi başka uygulamalar için değerlendirilmesi gerçekleştirilemez [78]. Bu sebeple kimyasal işleme alternatif olarak demineralizasyon ve deproteinizasyon için enzim ya da mikroorganizmaların kullanıldığı biyolojik prosesler önerilmektedir [79, 80].

Biyolojik yöntemde, karbon kaynağı olarak glukoz içeren ortamlarda mikroorganizmaların laktik asit üretmesi ile mineral giderimi; proteolitik enzimleri üretmesi ile de protein gideriminin gerçekleşmesi sağlanmaktadır. Ayrıca laktik asit ve proteaz üretimi için farklı mikroorganizmaların kullanılıp, demineralizasyon ve deproteinizasyon işlemlerinin aynı ortamda yapıldığı prosesler de bulunmaktadır [81, 82].

Biyolojik proseslerde en fazla kullanılan bakteri *Lactobacillus plantarum*'dur. Bu yöntemde uygun fermentasyon koşulları sağlanarak ortamda *Lactobacillus* yoluyla laktik asit üretilir. Laktik asit, kitin fraksiyonunda kalsiyum karbonat bileşiği ile reaksiyona girer ve kalsiyum laktat oluşur. Oluşan kalsiyum laktat çöker ve yıkama ile uzaklaştırılır [80]. Ortamda laktik asitin oluşması ayrıca pH'ın düşmesini ve proteazların aktivite göstermesini sağlar. Bu işlemler sonucunda protein, mineral ve astaksantin bakımından zengin sıvı fraksiyonu; katı olarak da kitin fraksiyonu elde edilir [83, 84]. Sıvı kısım, hayvan yemi ya da insanlar için protein-mineral katkı maddesi olarak kullanılabilir [79].

#### **2.4. Mikroorganizmalardan Kitin ve Kitosan Ekstraksiyonu**

Kabuklu deniz canlılarından kitin elde etmenin en büyük problemlerinden biri, bu kaynakların sezonluk temin edilebilmesidir. Kitin ve kitosanın uygulama alanları arttıkça, bu polimerlerin üretiminde sürekliliğinin sağlanması için alternatif kaynaklar bulma ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Hücre duvarlarında hem kitin hem de kitosan içeren funguslar bu açıdan uygun kaynaklar olarak görülmektedir ve fungusların avantajlı

yönleri bulunmaktadır. Fungus miselyumundan kitin ve kitosan ekstraksiyonu için düşük konsantrasyonlarda bazik ve asidik çözeltiler kullanılmaktadır; bu yönüyle çevre açısından güvenilir bir kaynaktır. Ayrıca, fungusların inorganik madde içeriklerinin çok düşük olmasından dolayı demineralizasyon işlemine gerek yoktur; bu açıdan da maliyeti kabuklulara göre daha azdır [5, 61].

Fungusların kitin ve kitosan içerikleri türlerine göre değişiklik göstermektedir. Zygomycetes (*Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Gongronella*, vd.) sınıfına ait olan fungusların hücre duvarları kitosan açısından [85]; Basidiomycetes (*Lentinula*, *Agaricus*, vb.) ve Ascomycetes (*Aspergillus*, *Fusarium*, vb.) sınıfına ait olan funguslar da kitin içeriği bakımından daha zengindir [86, 87]. *Mucor rouxii*, fungus kaynakları içerisinde en fazla çalışılanıdır ve kitosan içeriği kuru hücre ağırlığına göre %8.9–35 arasında değişmektedir [61]. Basidiomycetes sınıfındaki mikroorganizmaların kitin miktarları kuru ağırlığın %8.5-19.6'sı arasında değişmekte olup, kitosan miktarları %1 civarındadır [87]. *Aspergillus niger* küf mantarı ise en yüksek kitin içeriğine (%42) sahip mikroorganizma olarak belirtilmektedir [88]. *A. niger* ayrıca kuru ağırlığının %11'i civarında da kitosan içeriğine sahiptir [66, 89].

*Aspergillus niger* suşları endüstriyel ölçüde yaygın olarak sitrik asit ve diğer biyoteknolojik ve farmasötik ürünlerin üretiminde kullanılır. Sitrik asitin yıllık üretimi 1.7 milyon ton olarak belirlenmiştir ve bu prosesten yıllık 0.34 milyon ton *A. niger* miselyum atığı oluşmaktadır [6]. Ancak düşük verimden dolayı, endüstriyel ölçekte kitin ve kitosan üretimi için bu atıklardan faydalanılamamaktadır ve bu konuda bir sistemin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [90].

Kitin ve kitosan, fungus hücre duvarından baz ve asit muamelelerini kapsayan iki kademeli ekstraksiyon prosesi ile elde edilmektedir. İlk aşamada proteinler, yağlar ve alkali ortamda çözünen karbonhidratlar %2-4 (w/v) NaOH çözeltisinde, 90-121°C sıcaklıkları arasında, 15-120 dakika arasındaki sürelerde çözünür. Geriye hücre duvarının kitosan içeren, alkali çözünmeyen kısmı kalır. Bu kısım genellikle %2-10 (v/v) asetik asit çözeltisiyle, 25-95°C arasındaki sıcaklıklarda, 1-24 saat arasındaki sürelerde muamele edilir. Bu işlem ile çözünen kısım (kitosan içeriği bakımından zengin) ayrılır ve pH'ı 9-10'a yükseltilerek çökmesi sağlanır. Santrifüj ile çöken kısım ayrılıp aseton ve etanol ile yıkanarak kitosan elde edilir. Asetik asit muamelesi sonucu çözünmeyen kısımdan ise kitin elde edilir. [64, 91, 92].

Fungus biyokütlesinden elde edilen kitosanın verimi, seçilen fungus türüne, kültivasyon yöntemlerine ve sıcaklık, pH, inkübasyon süresi, karıştırma hızı gibi proses parametrelerine bağlı olarak değişmektedir. Kitosan verimindeki artış ya biyokütle miktarını arttırarak ya da hücre duvarındaki kitosan içeriğini arttırarak elde edilebilir [93].

Küflerin hücre duvarından direk elde edilen kitosanın birtakım avantajları vardır: (i) karides proteinlerinden kaynaklanan alerjik riski yoktur; (ii) molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi fermentasyon koşulları değiştirilerek kontrol edilebilir [94, 95]. Kabuklulardan elde edilen kitosan yüksek molekül ağırlığına (yaklaşık  $1,5 \times 10^6$  Da) sahipken, mikroorganizmalardan elde edilen kitosan daha düşük molekül ağırlığına ( $1-12 \times 10^4$  Da) sahiptir. Yüksek molekül ağırlıklı kitosanın nötr pH değerlerinde ve yüksek viskoziteye sahip sulu çözeltilerde çözünürlüğü zayıftır ve bu durum gıda, medikal ve ziraat alanlarındaki kullanım olanaklarını kısıtlamaktadır [96]. Mikroorganizmalardan elde edilen kitosan ise kolesterol absorpsiyonunda toz olarak ve birçok medikal uygulamalarda lif ya da membran olarak kullanılabilir [68]. Ek olarak, mikrobiyal kitosanın kabuklulardan elde edilen kitosandan daha yüksek biyoaktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir; bu özellik yine medikal uygulamalar için önemlidir [93].

## **2.5. Kitinden Kitosan Üretim Yöntemleri**

Kitinden kitosan elde etmek için, kitindeki asetil gruplarının bir kısmının veya tamamının uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlem de kimyasal olarak belirli reaksiyon koşullarında, alkali çözeltilerle ya da enzimatik olarak kitin deasetilaz enziminin yardımıyla gerçekleştirilebilmektedir.

### **2.5.1. Kimyasal Yöntem**

Kitinin kimyasal deasetilasyon prosesi, heterojen [7] olarak yüksek sıcaklıklarda ya da homojen [97] olarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmektedir. Heterojen yöntemde yüksek deasetilasyon derecelerinde; homojen yöntemde ise %48-55 deasetilasyon derecelerinde suda çözünür kitosan elde edilir. Endüstriyel uygulamalar için heterojen yöntem tercih edilmektedir [90].

Kitinin deasetilasyonu genellikle yüksek derişimde (%40-50 (w/v)) NaOH veya KOH çözeltisi kullanılarak,  $100^\circ\text{C}$  veya daha yüksek sıcaklıklarda; 30 dakika veya daha uzun sürede gerçekleştirilmektedir [98]. Sıcaklık, deasetilasyon süresi, baz derişimi,

kitin-baz çözeltisi oranı, atmosfer ve partikül büyüklüğü gibi faktörler, üretilmek istenilen kitosanın deasetilasyon derecesine göre farklılık göstermektedir [99].

Kitinin deasetilasyonunda yüksek sıcaklıklar deasetilasyon derecesini artırırken, molekül ağırlığını düşürmektedir. Yapılan çalışmalar sıcaklık ile deasetilasyon hızı arasında lineer bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur [19].

Deasetilasyon süresinin etkisinin incelendiği bir çalışmada, 100°C'de %50 (w/v) NaOH çözeltisi ile yapılan işlemde ilk bir saat içinde deasetilasyonun hızlı bir şekilde gerçekleştiği belirtilmiştir. Bir saatin sonunda %68 deasetilasyon derecesi elde edilmiş ve ikinci saatin sonunda bu değer sadece %78'e yükselmiştir. Bu çalışmada baz çözeltisi ile uzun süre yapılan muamelenin deasetilasyon işlemini önemli ölçüde etkilemediği ve depolimerizasyona yani molekül zincirinin küçülmesine sebep olduğu sonucu çıkmıştır [99]. Başka bir çalışmada ise yüksek basınç ve sıcaklık koşulları (15 psi/121°C) ile diğer metotlardan daha kısa sürede (30 dakika) yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosan elde edilmiştir [100].

Kitinin deasetilasyonu sırasında ortamdaki oksijen, polisakkarit zincirinin bozunmasına sebep olmakta ve bunun sonucunda elde edilen kitosanın viskozite ve molekül ağırlığını düşürmektedir. Bu durumlarda deasetilasyon, oksijenli ortamda absorplayıcı olarak tiyofenol kullanılarak ya da azotlu ortamda gerçekleştirilmektedir [101]. Deasetilasyon işleminde reaksiyonun düzenli bir şekilde ilerleyebilmesi için uygun bir karıştırma gereklidir. Bunun için de reaksiyon karışımının iyi bir akışkan ortamından olması gerekir; kitin-baz çözeltisi oranı da bu sebeple önemlidir [19].

Kimyasal metodun hızlı, etkili ve kolay uygulanabilir olması gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak kitinin kimyasal deasetilasyonu, geniş aralıkta molekül ağırlığına sahip kitosan üretimine ve deasetilasyonun polisakkarit molekülünde heterojen dağılımına sebep olmaktadır; böylece uygulamalar için bir standartlık sağlanamamaktadır. Proses koşulları ile değişen deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı da, birçok uygulama için önemli olan çözünürlük, vizkozite, biyolojik aktivite gibi özellikleri etkilemektedir [61]. Ayrıca, büyük hacimlerde derişik alkali (NaOH) çözeltilerinin kullanılması ve işlem sonucunda çeşitli azotlu atıkların oluşması çevre kirliliğine neden olmaktadır [6].



### 2.5.2. Enzimatik Yöntem

Enzimatik yöntem, funguslardan elde edilen kitin deasetilaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Kimyasal yöntemle göre daha kontrol edilebilir bir yöntem olup, homojen bir ürün oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca çevre açısından da daha güvenilirdir; böylece kimyasal metottaki birçok dezavantajı ortadan kaldırmaktadır [102].

Enzimatik yöntemin birçok avantajı bulunmaktadır ancak kitin deasetilaz enzimi çözünmez, kristalin kitine karşı çok etkili değildir. Enzimin deasetilasyon için kitindeki asetil gruplarına erişebilirliğini arttırmak amacıyla kitinin, ısıtma, sonikasyon, öğütme ve türevlerinin elde edilmesi gibi fiziksel ve kimyasal yöntemlerle ön muamele edilmesi gerekmektedir [103] .

Enzimatik yöntemde, substrat olarak genellikle glikol kitin, kitin-50 (DA, %50) ve kitin oligomerleri ( $DP \geq 2$ ) kullanıldığında daha etkili olmaktadır. Bu substratlar, suda çözünür ve amorf yapıda olup, bütün kitin deasetilazlar tarafından kolaylıkla deasetile edilebilmektedir. Bunun yanında, funguslardan elde edilen kitin ve kitosan da (DA, %30) enzimatik deasetilasyon için substrat olarak kullanılmaktadır. Cai ve arkadaşları, *Aspergillus niger* fungusundan elde edilen kitinin, kitin deasetilaz enzimi için iyi bir substrat olduğunu belirtmişlerdir [104].

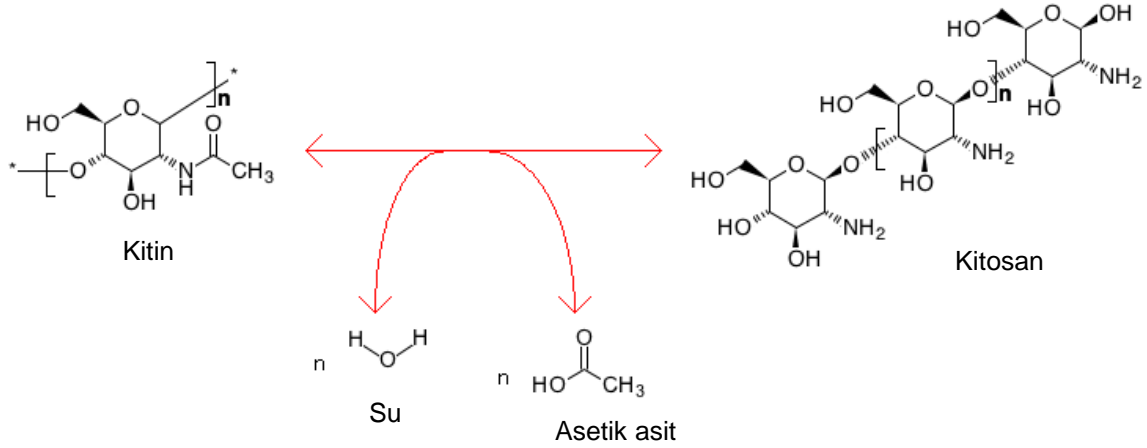
### 2.6. Kitin Deasetilaz Enzimi

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve amino asitlerin peptit bağlarıyla bağlanması sonucu oluşan, protein yapısındaki biyopolimerlerdir. Uluslararası Enzim Komisyonu, enzimleri katalizledikleri reaksiyonlara göre ayırmak için bir numaralandırma sistemi geliştirmiştir; buna göre enzimler altı ana grupta sınıflandırılmaktadır. Her enzim numarası "EC" harflerini izleyen, noktalarla ayrılmış dört sayıdan oluşur.

Kitin deasetilaz enziminin (CDA) sistematik adı kitin amidohidrolaz olup, enzim kodu "EC 3.5.1.41"dir ve bu sayılar şu enzim gruplarını belirtmektedir: EC 3 enzimleri hidrolazlardır (bir molekülü parçalamak için suyu kullanan enzimler); EC 3.5 peptit bağları hariç karbon-azot bağlarına etki eden hidrolazlardır; EC 3.5.1 ise lineer amittlere etki eden hidrolazlardır. Enzim numarasındaki dördüncü rakam grubu da, kitin deasetilazın hidrolazlar arasındaki özgül numarasını göstermektedir. Kitin deasetilaz enzimi ayrıca, Henrissat tarafından oluşturulan CAZy veritabanındaki

[105], karbonhidrat esteraz 4 (CE4) ailesi üyelerinden biridir. Karbonhidrat esteraz 4 ailesi, asetillenmiş ksilan, kitin ve peptidoglukan gibi substratların N- veya O-deasetillenmesini katalize eden enzimlerden oluşmaktadır [106].

Kitin deasetilaz enzimi, kitin ve kitosandaki N-asetilglukozamin birimlerindeki asetamido gruplarının hidrolizini katalizleyerek, glukozamin ve asetik asit oluşmasını sağlamaktadır (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Kitin deasetilaz enziminin katalitik reaksiyonu [107]

Kitin deasetilaz enzimi fungus, böcek ve denizde yaşayan bazı bakteriler gibi yapılarında kitin bulunduran canlılar tarafından üretilmektedir. Fungus kaynaklı kitin deasetilaz enzimlerinin, hücre duvarı üretimi ve bitki-patojen etkileşimleri olmak üzere iki farklı biyolojik görevinin olduğu belirtilmektedir. *Mucor rouxii* fungusunda kitin ve kitosan biyosentezinin incelendiği bir çalışmada kitin sentaz (EC 2.4.1.16) ve kitin deasetilaz enzimlerinin birbirlerine bağlı olarak çalıştıkları gözlemlenmiştir. Buna göre, kitin sentaz enzimi üridin-5-difosfo-N-asetil-glukozamini (UDP-Glc-NAc) kullanarak kitin zincirini sentezlerken (2.2), kitin deasetilaz enzimi kitin zincirindeki N-asetamido bağlarını hidrolize etmektedir (2.3) [9]. *Absidia coerulea* fungusuyla yapılan bir çalışmada da aynı durum elde edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, kitin deasetilaz enziminin hücre duvarının iç yüzünde yani periplazmik bölgede bulunduğu belirtilmektedir [10].

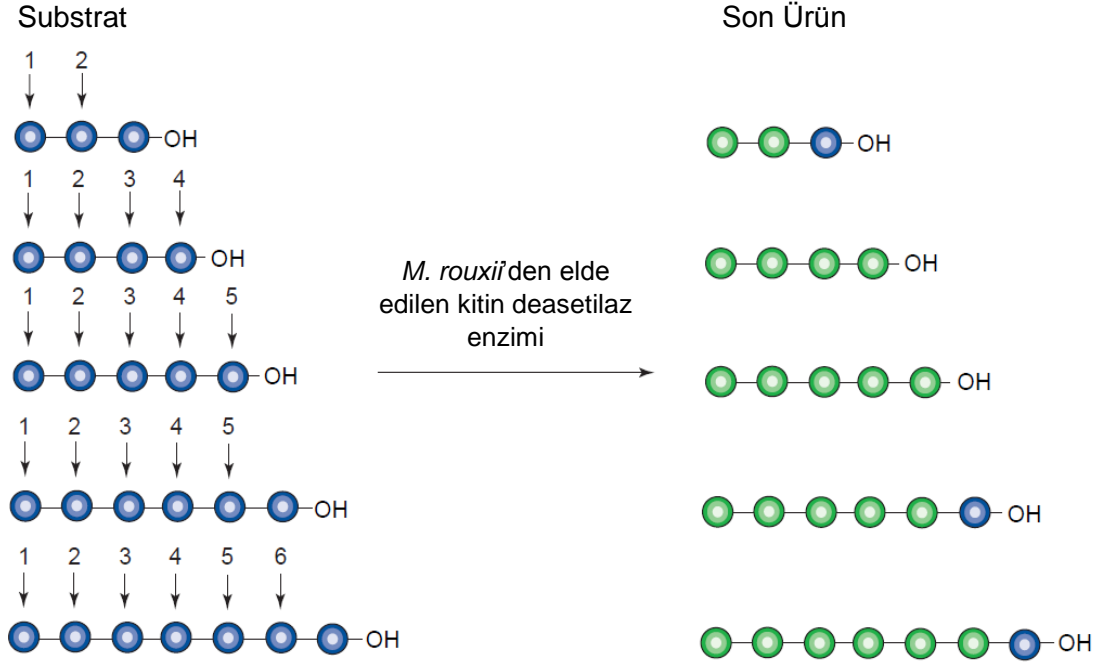


*M. rouxii* ve *A. coerulea* funguslarındaki kitin deasetilaza benzer biyolojik rol, *Saccharomyces cerevisiae* mayasında da gözlemlenmiştir. Bu mayada askospor (eşeyli çoğalma sonucu oluşan spor) duvarı oluşumu için kitin sentezi ve kitin deasetilasyonu gereklidir. Kitosan içerikli spor duvarı, yapısal sertliği ve dış etkenlere karşı direnci sağladığından maya için önemlidir. *S. cerevisiae* mayasında kitin, üç kitin sentaz enzimi (Chs1, Chs2 ve Chs3) tarafından sentezlenmekte olup, bu enzimler arasında Chs3 önemli bir rol oynar. Bu mayada kitinin deasetilasyonu için de sorumlu iki gen (CDA1 ve CDA2) tanımlanmıştır. Bu genler, maya spor duvarı oluşumundaki rollerinin araştırılması amacıyla izole edilmiştir. Çalışmalar sonucunda Cda2p enziminin Cda1p enzime göre daha aktif olduğu ve kitosan içerikli spor duvarının oluşumundan sorumlu olduğu görülmüştür [12, 108].

Kitin deasetilaz enzimlerinin bitki-patojen etkileşimlerindeki rolü, *Colletotrichum lindemuthianum* gibi bitki patojeni funguslardan elde edilen ekstraselüler ve kitin oligomerlerinde aktif kitin deasetilazlarda incelenmiştir. Kitin oligomerleri bitkilerin savunma mekanizmalarını güçlendirirken, kitosanın böyle bir etkisi bulunmamaktadır. Bu sebeple, kitin deasetilazlar, kitin oligomerlerini kitosana dönüştürerek, bitkilerin savunma aktivitelerini azaltmaktadır [109]. Bitkiler ayrıca funguslara karşı savunma mekanizması olarak endokitinaz enzimini (kitini parçalayan enzim) üretirler. Fungusların bitki dokusunu penetre etmesi sırasında, hücre duvarındaki kitini kitosana çevirdiği ve bu dönüşümün fungus açısından bitki endokitinazına karşı bir savunma reaksiyonu olabileceği rapor edilmiştir [110].

Kitin deasetilaz enzimlerinin etki mekanizmaları, substrat olarak suda çözünebilir kitin polimerleri [111] ve kitin oligomerleri [112] kullanılarak incelenmiştir. Polimer dereceleri 2 ile 7 arasında olan, kitin oligomerleri ile yapılan çalışmada, *M. rouxii* fungusundan elde edilen enzim kullanılmıştır. Oligomer zincirinin uzunluğunun kitin deasetilazın reaksiyon mekanizması için önemli olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2.5). Enzimin polimerizasyon derecesi üçün altında olan kitin oligomerlerini deasetillemekte etkili olamadığı görülmüştür. Ayrıca, polimer dereceleri 4 ve 5 olan kitin oligomerlerini tamamen deasetillerken, polimer dereceleri 3, 6 ve 7 olan kitin oligomerlerinin indirgeyici uçlarına etki etmemiştir dolayısıyla monomerlerin hepsi asetillenmemiştir (Şekil 2.5). Kitin deasetilaz enziminin kitin oligomerlerde reaksiyona indirgeyici olmayan uçtaki asetil grubunun uzaklaştırılmasıyla başlayıp, sonra sırasıyla diğer asetamido gruplarına geçtiği belirtilmektedir. Bu mekanizma,

polimerik substratlarda da aynı şekilde gerçekleşmektedir. Enzimatik reaksiyonun iyi tanımlanmış bir reaksiyonda gerçekleşmesi, deasetilasyonun heterojen gerçekleştiği kimyasal deasetilasyona göre avantaj sağlamaktadır [113].



**Şekil 2.5.** *M. rouxii*'den elde edilen kitin deasetilaz enziminin kitin oligomerleri üzerindeki etki mekanizması. Mavi küreler, N-asetil-D-glukozamin birimlerini; yeşil küreler ise onların deasetillenmiş karşılıklarını (D-glukozamin) simgelemektedir. Numaralandırılmış oklar deasetilasyon mekanizmasının sırasını ve konumunu göstermektedir [113].

### 2.6.1. Fungus Kaynaklı Kitin Deasetilaz Enzimlerinin Özellikleri

Kitin deasetilaz enzimi ilk olarak *Mucor rouxii* fungusundan elde edilmiştir [114]. Kitosanın kullanımı yaygınlaşmaya başladıkça, kitin deasetilazların farklı fungus türlerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar da artmıştır. Çizelge 2.4'te çalışılan fungus türleri ve saflaştırılan kitin deasetilaz enzimlerinin molekül ağırlığı, optimum sıcaklık ve pH gibi özellikleri verilmektedir.

**Çizelge 2.4.** Farklı funguslardan elde edilen kitin deasetilazların özellikleri

Fungus	Optimum pH/T (°C)	Molekül Ağırlığı (kDa)	Kaynak
<i>Absidia coerulea</i>	5.0 / 50	75	[10]
<i>Aspergillus nidulans</i> *	7.0 / 50	27	[11]
<i>C. lindemuthianum</i> (ATCC 56676)*	12 / 60	32-33	[115]
<i>C.lindemuthianum</i> (DSM 63144)*	8.5 / 50	150	[109]
<i>Mortierella</i> sp. DY-52*	6.0 / 60	52,67	[116]
<i>Mucor rouxii</i>	4.5 / 50	75-80	[9]
<i>Penicillium oxalicum</i> SAEM-51*	9.0 / 50	53	[117]
<i>Rhizopus circinas</i>	5.5-6.0 / 37	75	[15]
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	7.5 / 55	55	[104]
<i>S. cerevisiae</i> Cda2p	8.0 / 50	43	[118]

\* ekstraselüler kitin deasetilaz enzimi

Çizelgede verilen mikroorganizmalardan *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans* ve *Colletotrichum lindemuthianum*'un iki suşu en çok çalışılan fungus türleridir. Çalışmalarda elde edilen enzimlerin fonksiyonlarına göre ya periplazmik bölgeye (intraselüler enzim) ya da kültür ortamına (ekstraselüler enzim) salgılandıkları görülmektedir. Enzimlerin özellikleri karşılaştırıldığında, kitin deasetilazların hepsi glikoprotein yapısındadır, optimum sıcaklıkları çoğunlukla 50-60°C civarındadır; ancak molekül ağırlıkları, karbonhidrat içerikleri ve optimum pH değerleri türlere göre çeşitlilik göstermektedir. Karbonhidrat içerikleri %20-70 arasında değişmektedir. *C. lindemuthianum* DSM 63144 fungusunda bulunan kitin deasetilaz hariç diğer kitin deasetilazların molekül ağırlıkları 25-80 kDa arasında değişmektedir. Optimum pH değerleri ise ekstraselüler enzimler için nötr ya da 7-12 arasında iken intraselüler enzimler için 4.5-6 arasındaki değerlerdir. Ayrıca enzimlerin optimum sıcaklıklarında olağanüstü bir termal stabilite gösterdikleri ve suda çözünebilen N-asetil-D-glukozamin polimerlerine karşı güçlü bir spesifisiteye sahip oldukları belirtilmektedir.

Aktivatörler enzim aktivitesi artıran, inhibitörler ise enzim aktivitesini azaltan moleküllerdir. EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) ya da  $Co^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Na^{+}$  gibi metal iyonları konsantrasyonlarına bağlı olarak kitin deasetilaz enzimine aktivatör veya inhibitör olarak etki etmektedirler. Örneğin, Tokuyasu vd. tarafından yapılan bir çalışmada  $Zn^{+2}$  (1 mM) iyonunun, *C. lindemuthianum* fungusundan saflaştırılan kitin deasetilaz enziminin aktivitesini arttırdığı ancak bu iyonun konsantrasyonu 10 mM'a yükseltildiğinde inhibitör olarak etki etmediği gözlemlenmiştir [115]. Ayrıca, iyonların varlığının kitin deasetilaz aktivitelerine etkisi, enzimlerin elde edildiği kaynaklara

göre de değişmektedir. *S. cerevisiae* ve *C. lindemuthianum* mikroorganizmalarından elde edilen enzimlerin  $Co^{+2}$  varlığında aktivitesi artarken [109, 118], *A. nidulans* fungusundan elde edilen enzim inhibe olmaktadır [11].

### 2.6.2. Kitin Deasetilaz Enziminin Rekombinant Ekspresyon ile Üretilmesi

Kitinin kitosana enzimatik deasetilasyonunu sağlayan kitin deasetilaz enzimlerinin, endüstriyel ölçekli kullanılması için funguslardan elde edilen düşük ekspresyon seviyelerinin yükseltilmesi gerekmektedir. Bunu gerçekleştirmenin en etkili yollarından biri de genetik mühendisliği teknolojisidir [119]. Kitin deasetilaz enzimlerinin *Escherichia coli* ve *Pichia pastoris* gibi farklı sistemlerde ekspresyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Ancak birçoğu düşük üretim seviyesi ya da yetersiz enzim aktivitesi gibi sebeplerden dolayı başarılı olamamıştır. Bu çalışmalarda seçilen genler ve konak hücreler Çizelge 2.5'te verilmektedir.

**Çizelge 2.5.** Kitin deasetilazın heterojen ekspresyonu için seçilen gen kaynakları ve konak hücreler

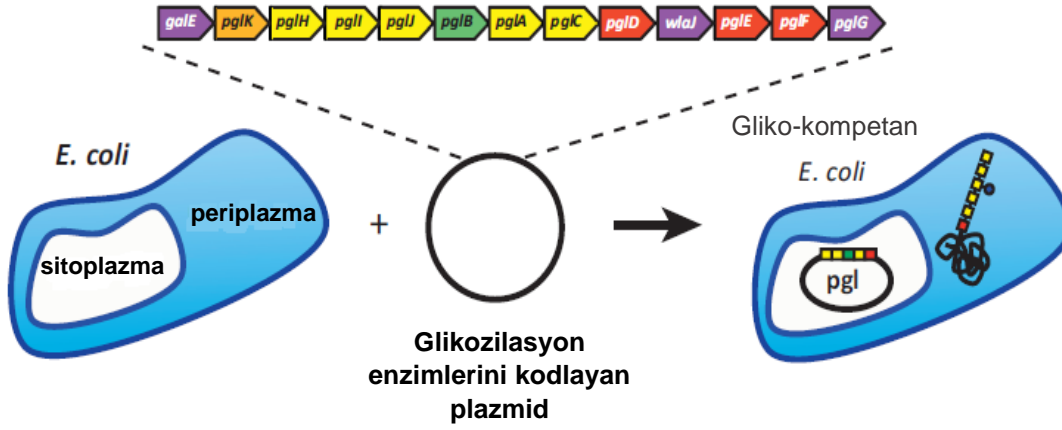
CDA kaynağı	Konak hücre	Kaynak
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>E. coli</i>	[13]
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (UPS9)	<i>P. pastoris</i>	[119]
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (ATCC 56676)	<i>E. coli</i>	[120]
<i>Flammulina velutipes</i>	<i>P. pastoris</i>	[121]
<i>Rhizopus circinans</i>	<i>P. pastoris</i>	[15]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cda2p	<i>E. coli</i>	[14]

Çizelgede verilen çalışmalarda, *E. coli* bakterisinde üretilen kitin deasetilaz enziminin doğal yapısına benzer bir yapıda yani glikoprotein olarak üretiminin gerçekleştirilemediği belirtilmektedir. Bu durum da, enzimin bazı karakteristik özelliklerinin değişmesine ve yeterli enzim aktivitesinin görülememesine sebep olmaktadır. Martinou ve arkadaşları, *S. cerevisiae* mayasından saflaştırılan CDA2 geninin *E. coli* bakterisine transfer edildiği zaman, enzimin glikoprotein yapıda olmaması sonucunda, enzim aktivitesini tamamen kaybettiğini bildirmiştir. Ancak ortama 1 mM  $CoCl_2$  ilave edilmesi ile enzim yeniden aktif hale getirilmiştir.  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  gibi iyonların da aktiviteye etkisi incelenmiş, fakat bu iyonlar  $Co^{+2}$  ile aynı etkiyi göstermemiştir. Ayrıca glikozilasyonun olmamasından dolayı *E. coli*'de üretilen enzimin *S. cerevisiae*'da üretilen doğal (native) enzime göre daha termolabil (ısıya kararsız) olduğu da belirtilmektedir [14].

Glikozilasyon, proteinlerin sentezlendikten sonra meydana gelen translasyon değişimlerinden (post-translational modifications) biridir. Glikozilasyonda monosakkaritler, glikozit bağlarla birbirine bağlanarak protein, lipit gibi biyomoleküllere kovalent bağlı glikanlar oluşturmaktadır. Ökaryotik proteinlerin %50'sinden fazlasının glikozillenmiş olduğu tahmin edilmektedir [122]. Glikozilasyon birçok amino asit kalıntısında (rezidü) meydana gelmekte olup, en yaygın olanları asparajin (N-bağlı) ve serin ya da treonin (O-bağlı) amino asit rezidülerinde gerçekleşen glikozilasyonlardır [123].

Glikoproteinlerdeki glikanlar, proteini termal denaturasyona karşı stabilize ederler, daha geniş pH aralığında ve yüksek sıcaklıklarda daha fazla dayanıklılık göstermelerini sağlarlar [124-127], proteini proteolitik parçalanmaya karşı korurlar ve enzimlerin agregat (yığışım) oluşturmalarını engellerler [128-130]. Bu sebeple glikozilasyon, proteinin yapısal kararlılığı ve fonksiyonel özellikleri bakımından, endüstriyel enzimlerde ve terapötik proteinlerde vazgeçilmezdir [131]. Glikozilasyon, kitin deasetilaz enzimi açısından da daha önceden bahsedildiği gibi enzimin aktivitesini, ısı kararlılığını ve üretim verimini etkilediği için önemlidir.

Ökaryotik hücreler, glikozile edilmiş aktif bir proteini sentezleyebilme yeteneğine sahiptir; ancak yakın zamana kadar glikoprotein yapısındaki enzimlerin bakteriler tarafından üretimi sağlanamamıştır. *Escherichia coli* bakterisi, ilaç, deterjan, tekstil, kağıt gibi çeşitli endüstrilere yönelik rekombinant protein üretiminde en çok tercih edilen organizmaların başında gelmektedir. Glikozilasyon mekanizmalarının bakterilerde varlığının keşfedilmesiyle [17], *Campylobacter jejuni* bakterisinde bulunan basit bir protein glikozilasyon gen bölgesi (Pgl), *E. coli* bakterisine aktarılarak (Şekil 2.6), endüstriyel önem teşkil eden bu bakteriye proteinleri glikozilleme yeteneği kazandırmıştır [18]. Dolayısıyla *E. coli*'den glikoprotein üretimi, endüstri için henüz çok yeni bir kavramdır. Bakterilerde üretilen glikoproteinlerdeki glikozilasyon, ökaryotlarınkinden farklı yapıda olmasına rağmen glikozilasyonun yapısından ziyade varlığının termal-stabiliteyi arttırdığı ve proteolitik parçalanmayı engellediği düşünülmektedir.



**Şekil 2.6.** Glikozilasyon enzimlerini kodlayan plazmid sayesinde *E. coli* bakterisinin gliko-protein yapısında protein üretebilmesini sağlayan pgl lokusunun şematik gösterimi [132]

### 2.6.3. Kitin Deasetilaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Kitin deasetilaz aktivitesi radyoaktif [114], kolorimetrik [133], kromatografik [134] ve enzimatik [135] yöntemlerle tayin edilmektedir. Bu yöntemlerde glikol kitin [9, 115], koloidal kitin, toz kitin, karboksimetil kitin [11] gibi farklı deasetilasyon derecelerinde farklı substratlar kullanılmakta olup kitinin suda çözünebilir bir türevi olan glikol kitin, en çok kullanılan substrattır.

Kauss ve Bauch tarafından geliştirilen, güvenilirlik ve doğruluk derecesi yüksek olan kolorimetrik yöntem en yaygın kullanılan metotlardan biridir [133]. Bu yöntemde, glikol kitinin depolimerizasyonu için sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) ve reaksiyon sonucu salınan glukozaminin kolorimetrik olarak belirlenmesi için 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone (MBTH) kullanılmaktadır. Bu metoda göre bir ünite enzim, glikol kitin ile inkübe edildiğinde 1 dakikada 1  $\mu\text{g}$  glukozamin birimleri oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Kitin deasetilaz aktivitesi ayrıca, Bergmeyer tarafından bulunan üç enzim reaksiyonunun gerçekleştiği enzimatik metot ile, reaksiyon sonucu açığa çıkan asetatın ölçülmesiyle de belirlenmektedir. Bu yöntemde bir ünite enzim, hexa-N-acetylchitohexaose ile inkübe edildiğinde, 1 dakikada 1  $\mu\text{mol}$  asetat oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır [135].



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. Kerevit ve Karides Kabuğu

Kitosan üretimi için kullanılan kerevit kabukları Ankara, Gölbaşı'ndaki Belçikalı'nın Yeri restoranından; karides kabukları ise bu ürünleri satan çeşitli marketlerden temin edilmiştir. Alınan kabuklar, işlem öncesinde üzerlerindeki çözünür organik maddelerin ve yapışmış proteinlerin uzaklaştırılması için, suyla iyice yıkanmıştır. Daha sonra, uygulanacak kimyasal işlemlerin etkinliğini arttırmak için havanda küçük parçalar haline getirilip, sırasıyla 177, 125 ve 75 µm aralıklı eleklerden geçirilmiştir.

##### 3.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar, Merck, Sigma-Aldrich ve Fluka markalarından birine sahip olup, tümü analitik saflıktadır.

##### 3.1.3. Tamponlar ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan tamponlar ve çözeltiler (Ek 1 ve Ek 2) ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Genetik çalışmalarda kullanılan çözeltiler, ya 0.2 mikron filtreden (Sartorius AG, Göttingen, Germany) geçirilerek ya da 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak (Raypa, AES 110, İspanya) sterilize edilmiştir.

##### 3.1.4. Mikroorganizmalar, Çoğalma Ortamı ve Plazmidler

Mikrobiyal kitin ve kitosan kaynağı olarak seçilen *Aspergillus niger van Tieghem* fungusu, United States Department of Agriculture, (USDA)'dan temin edilmiştir. *A. niger*'in çoğaltılması için kullanılan besiyeri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Steril besi ortamlarında çoğaltılan mikroorganizmalar, gliserol içeren çözeltilerde -80°C'de saklanmıştır.

**Çizelge 3.1.** *Aspergillus niger* için besi ortamı

Bileşen	Derişim (g/l)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.025
KCl	0.025
NaNO <sub>3</sub>	1.5
Maya özü	1.6
Glikoz	100

Klonlama çalışmalarında *E. coli* DH5 $\alpha$  suşu (*F*-  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17 (rK*-, *mK*+) *phoA supE44*  $\lambda$ - *thi-1 gyrA96 relA1*), enzim üretim çalışmalarında ise *E. coli* CLM24 [136] ve *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen) suşları kullanılmıştır. Bakterilerde glikozilasyonu sağlamak için pPgl $\Delta$ B ve pMAFpgl (laboratuvar stoğu) plazmidleri; *Saccharomyces cerevisiae*'dan elde edilen *cda2* genini (laboratuvar stoğu) klonlamak için ise pET28a (Novagen) ve pTrc99A [137] plazmidleri kullanılmıştır.

*E. coli* suşlarını çoğaltmak için Luria Bertani (LB) besi ortamı kullanılmıştır. Çizelge 3.2'de sıvı üretim ortamının bileşenleri verilmiştir. Katı ortam için, bu ortama 20 g/l agar eklenmiştir. Hazırlanan ortamlar, otoklavda sterilize edilerek, oda koşullarında saklanmıştır.

**Çizelge 3.2.** LB ortamı bileşeni

<b>Bileşen</b>	<b>Derişim (g/l)</b>
Tripton	10
NaCl	10
Maya özü	5.0
pH	7.0

Sıvı üretim ortamlarına ayrıca, çoğalma evresinde 20 g/l glukoz veya üretim evresinde 0.1 mM Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ve gerekli antibiyotikler (100  $\mu$ g/ml ampicilin, 20  $\mu$ g/ml kloramfenikol, 50  $\mu$ g/ml trimetoprim veya 50  $\mu$ g/ml kanamisin) eklenmiştir. Mikroorganizmalar, uzun süre depolanabilmesi amacı ile %15 gliserol içeren 1 ml LB ortamında, -80°C'de saklanmıştır.

### **3.2. Kabuklulardan Kitin Eldesi**

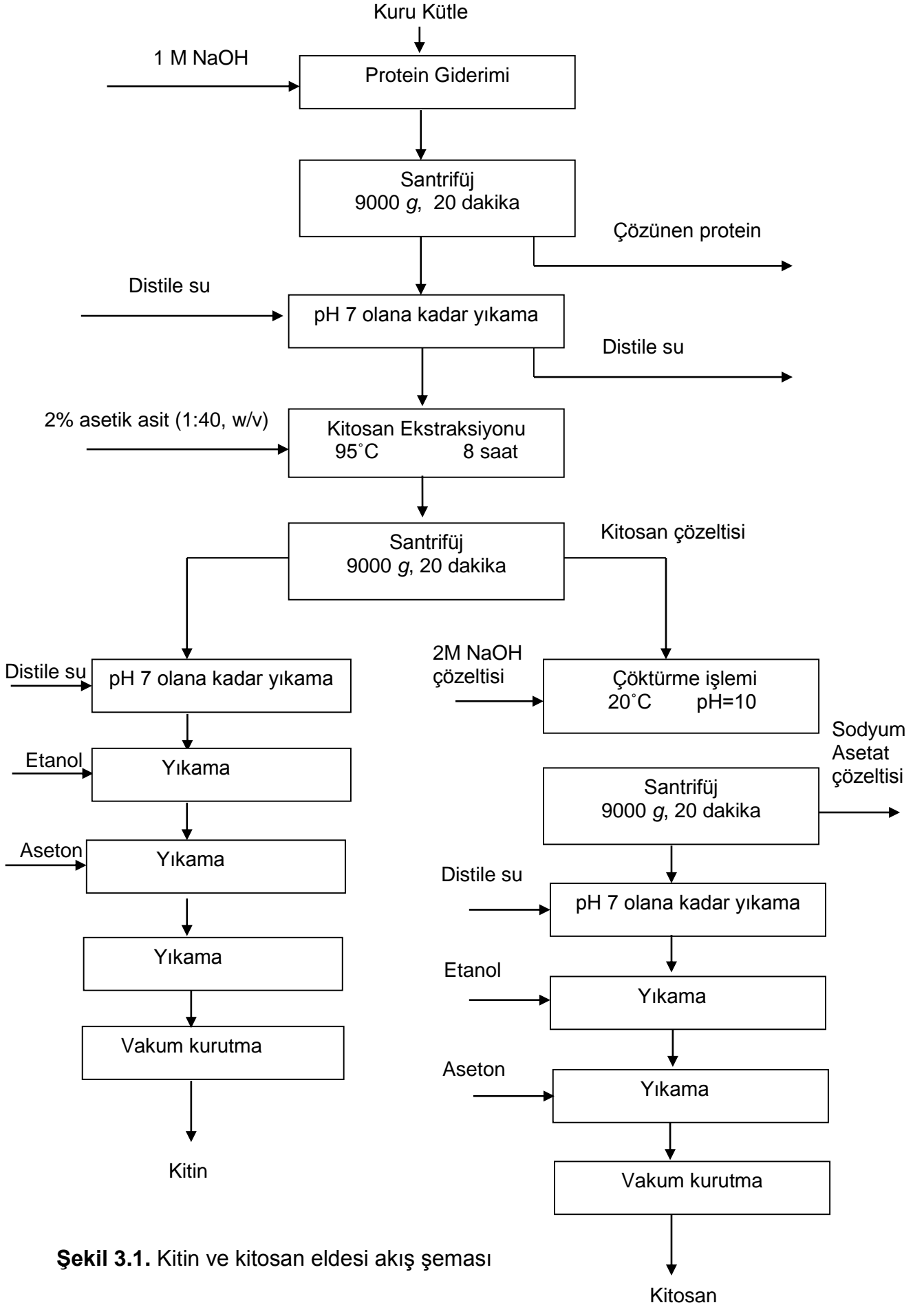
Kerevit ve karides kabuğu atıklarından kitin elde etmek amacıyla deproteinizasyon, demineralizasyon ve dekolorasyon işlemleri literatürde yer alan protokoller [76] doğrultusunda uygulanmıştır. Deproteinizasyon için, %3.5 (w/v) NaOH çözeltisi, 65°C'de 2 saat boyunca, 1 gram kabuğa 10 ml çözelti olacak şekilde kullanılmıştır. Demineralizasyon için, 1 M HCl çözeltisi oda sıcaklığında, 30 dakika boyunca, 1 gram kabuğa 15 ml çözelti olacak şekilde kullanılmıştır. Bu adımlar arasında, santrifüj ve filtrasyon ile katı kısım ayrılarak, oluşan protein ve mineral çözeltilerinin uzaklaştırılması işlemi yapılmıştır. Dekolorasyon işlemi için ise, aseton veya 9:1 oranında hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):%33 HCl çözeltisi hazırlanarak içine elde edilen

kitin parçaları atılmış ve bir gece beklemeye bırakılmıştır. Ertesi gün beyazlamış olan kitin parçaları filtrasyon ile ayrılarak, nötr olana kadar saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra etüv içerisinde 60°C'de 1 gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Her bir aşamada elde edilen katı kısımlar etüvde kurutulmuş ve miktar tayini yapmak üzere ağırlıkları tartılmıştır.

### **3.3. *Aspergillus niger* Küfünden Kitin ve Kitosan Eldesi**

*Aspergillus niger* küfünden kitin ve kitosan elde etmek için, ilk önce mikroorganizmanın çoğaltılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, hazırlanan besi ortamı 250 ml'lik erlenlere 135 ml'lik çalışma hacminde konulmuş ve hazırlanan erlenler 121°C sıcaklıkta, 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilizasyon otoklavında steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, -80°C'den alınan stoklar, çeker ocakta besi ortamlarına inoküle edilmiş ve sıcaklığı 30°C, karıştırma hızı 150 dev/dak. olan orbital çalkalamalı inkübatörde (Edmund Bühler, KS 15, Almanya) çoğaltılmışlardır. Çoğalma gözlemlenen *Aspergillus niger* biyokütle örnekleri, filtrasyon ile (No.1; Whatman) besi ortamından ayrılıp, saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra, kuru ağırlığı belirlemek amacıyla etüvde 60°C'de bir gün boyunca kurumaya bırakılmıştır.

Şekil 3.1'te literatürde yer alan protokolden [66] uyarlanan kitin ve kitosan eldesi akış şeması verilmiştir. Buna göre, ilk olarak küf miselyumları filtrasyonla ayrımı yapıp kurutulduktan sonra, protein giderimi için 1 M NaOH, ile kuru ağırlık NaOH oranı, 1 gram ağırlığa 30 ml NaOH çözeltisi olacak şekilde muamele edilmiştir. Biyokütlenin NaOH çözeltisi ile muamelesi farklı sıcaklıklarda denenmiştir. Bu işlemden sonra oluşan karışım santrifüjlenmiş ve çöken katı, bazikliği gidermek amacıyla saf su ile yıkanarak pH'nın 7 olması sağlanmıştır. Elde edilen kısım bir gün boyunca 60°C'de kurumaya bırakılmıştır. Kalan kütleden kitosanın belirlenebilmesi için katı kısım, % 2 (v/v) asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH) çözeltisi ile kuru ağırlık asetik asit oranı 1:40 olacak şekilde 95°C'de 8 saat ekstraksiyona bırakılmıştır. Santrifüjlendikten sonra, çözünmeyen kısım (kitin) ayrılıp; distile su, aseton ve etanol ile yıkanıp vakum altında kurutularak çalışmanın ileri aşamalarında kullanılmak üzere saklanmıştır. Süpernatantın (üst sıvı) ise pH'ı 2 M NaOH çözeltisi ile 10'a ayarlanıp, reaksiyon sonucu oluşan sodyum asetatı ayırmak amacıyla tekrar santrifüjlenmiştir. Çöken katı madde (kitosan), sırasıyla distile su, etanol ve aseton ile yıkandıktan sonra 60°C'de vakumda kurutulmaya bırakılmıştır.



**Şekil 3.1.** Kitin ve kitosan eldesi akış şeması

### **3.4. Genetik Mühendisliği Teknikleri**

Moleküler genetik metodları standart protokoller [138] doğrultusunda uygulanmış olup, izlenen adımlar Şekil 3.2’de özetlenmiştir.

#### **3.4.1. *E. coli*’den Plazmid DNA’nın İzolasyonu**

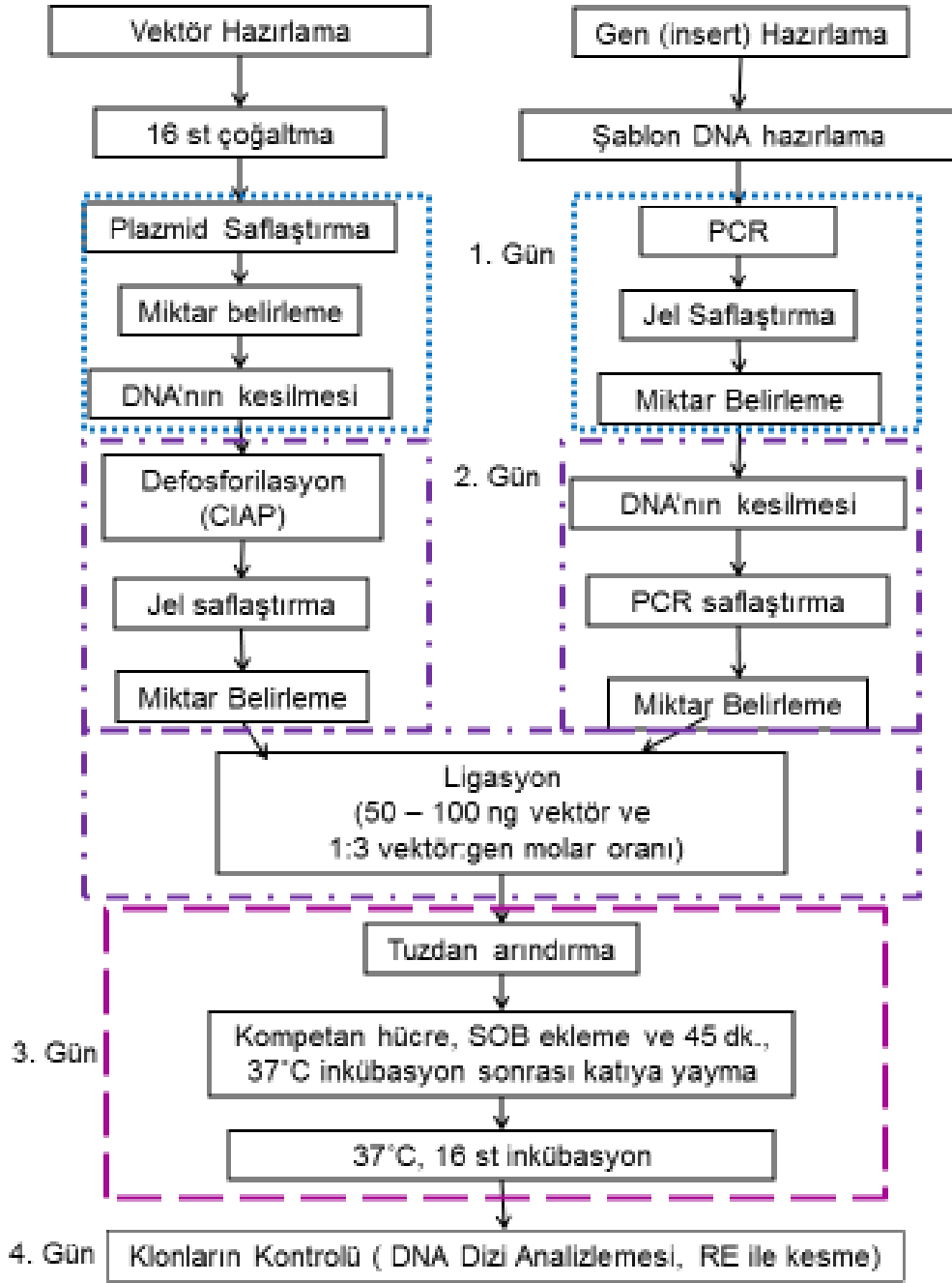
Plazmid DNA, *E. coli* hücrelerinden Qiagen Mini-Prep Kiti (Qiagen, Valencia, CA,US) ile üreticinin tavsiye ettiği protokole uygun olarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla seçici katı ortamdan tek bir koloni 5 ml seçici sıvı ortama inoküle edilerek, 37°C ve 200 rpm’de 16 st çoğaltılmıştır. Ekstraksiyon basamakları sonunda 50 µl’lik elüsyon tamponu ve santrifüj kolonu kullanılarak saflaştırılan plazmid, -20°C’de saklanmıştır.

#### **3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi**

Jel elektroforezi, DNA moleküllerinin tanınması ve ayrılması için kullanılmıştır. Bunun için öncelikle, 1 g agaroz 100 ml 1xTBE’de, agaroz çözünene kadar ısıtılmıştır. Karışım soğutulduktan sonra, son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenmiş ve çözelti jel tepsisine dökülmüştür. Yükleme kuyularının oluşması için uygun tarak yerleştirilmiş ve jelin katılaşması beklenmiştir. Jel tankı 1xTBE ile doldurulmuştur. Katılaştıran jel, tarak çıkarıldıktan sonra, elektroforez haznesine yerleştirilmiştir. Yükleme tamponuyla karıştırılan DNA örnekleri ve DNA standardı jele yüklenmiştir. 100 V’da 45-60 dk koşturulan DNA’nın bantları, transillüminatör cihazının üstünde incelenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir.

#### **3.4.3. DNA’nın Agaroz Jelden Ekstraksiyonu**

Bu aşamada ilk önce klonlamada kullanılacak gen parçalarının bulunduğu bantlar küçük bir maket bıçağı ile jelden kesilmiştir. Kesilen parçaların jelden ve tuzlardan uzaklaştırılması, QIAquick Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen) ile üreticinin tavsiye ettiği protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem gereği; öncelikle istenen DNA molekülünü içeren jel parçası uygun çözeltilerle karıştırılarak 65°C’de çözülmüş ve santrifüj kolonuna yüklenmiştir. Protokolun sonunda DNA, 50 µl elüsyon tamponu ile kolondan saflaştırılmıştır.



**Şekil 3.2.** Klonlama prosedürünün şematik gösterimi

#### 3.4.4. Primer Tasarımı

Polimeraz zincir reaksiyonlarıyla (PCR) gen derişiminin artırılabilmesi için gerekli olan primer tasarımları, bazı parametreler göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Bu parametreler aşağıda listelenmiştir:

1. Primer 16-60 nükleotit uzunluğunda olmalıdır.
2. Primerin 3' ucu, bir ya da iki G ya da C bazlarını içermelidir ve özgün olmayan bağlanmanın gerçekleşmesini önlemek için üçten fazla bulunmamasına dikkat edilmelidir.
3. Primerin baz içeriği %40-60 arası GC taşıyacak şekilde olmalıdır.
4. Saç tokası (hairpin) oluşturmaması için primer, kendi içinde eşlenik baz dizileri içermemelidir.
5. Dimer oluşmaması için primer çiftleri, birbirleri ile eşlenik baz dizileri içermemelidir.
6. Primer çiftlerinin erime sıcaklıkları ( $T_m$ ) arasındaki fark 5°C'yi geçmemelidir.

Çalışmada kullanılan primerlerin dizisi ve restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri Çizelge 3.3'te verilmektedir. Tercih edilmeyen primer dimerlerinin oluşması, primerin kendini tamamlayıcı sekansları içermesi olasılığı ve erime sıcaklığı gibi parametreler, Oligo 2.0 bilgisayar programı ile kontrol edilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Çalışmada kullanılan primerler

Primer adı	Dizi (5'-> 3')
Xba1-cda2-f	TATCAGTCTAGAGCAGCTACAAAACGCCTTTTC
Sall-cda2-r	AATGAAGTCGACGGACAAGAATTCTTTTATGTAATCAAT TCC
HindIII-cda2-r	ATAGAAAAGCTTTTAGTGTTGATGGTGATGATGGGACA AGAATTCTTTTATGTA ATC

#### 3.4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR ile DNA dizisinin çoğaltılması, termal döngü cihazında (Biorad, T100™) gerçekleştirilmiştir. 50 µl hacmindeki reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlanmış olup, aşağıda verilenleri içermektedir:

- 5X PCR reaksiyon tamponu : 10 µl
- dNTP (10 mM stok) : 1 µl
- İleri primer (5µM stok) : 0.8 µl
- Geri primer (5µM stok) : 0.8 µl

- Şablon DNA : 1 µl (100 ng)
- Taq DNA polimeraz (1U µl<sup>-1</sup>) : 0.5 µl
- Steril dH<sub>2</sub>O : 36 µl

PCR işleminde her bir döngü için ayarlanan sıcaklık değerleri Çizelge 3.4'te verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** PCR reaksiyon parametreleri

1 döngü	T <sub>1</sub> = 98°C	30 sn
	T <sub>1</sub> = 98°C	8 sn
34 döngü	T <sub>2</sub> = 51°C	30 sn
	T <sub>3</sub> = 72°C	20 sn
1 döngü	T <sub>3</sub> = 72°C	5 dak
	T <sub>4</sub> = 4°C	∞

PCR işlemleri gerçekleştirildikten sonra 8 µl PCR karışımından alınarak %1'lik agaroz jelinde analiz edilip, jelin fotoğrafı çekilmiştir.

#### 3.4.5.1. PCR Sonrası DNA'nın Saflaştırılması

PCR sonrasında primerlerin, nükleotidlerin, polimerazın ve tuzların uzaklaştırılması, QIAquick PCR Saflaştırma Kiti (Qiagen) kullanılarak, üreticinin tavsiye ettiği protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış DNA'nın elüsyonu, santrifüj kolonlarından 50 µl'lik EB tampon ile gerçekleştirilmiştir.

#### 3.4.6. DNA'nın Restriksiyon Enzimleri Kullanılarak Kesimi

Restriksiyon enzimleri (NEB, US) ile kesme reaksiyonu, mikrosantrifüj tüpünde gerçekleştirilmiş olup, aşağıda verilenleri içermektedir:

- DNA : 0.1 - 5 µg
- 10x Reaksiyon tamponu : 2 µl
- Restriksiyon enzimi : 10 U/µg DNA
- Steril dH<sub>2</sub>O : 20 µl'ye kadar

Örnekler, 37°C'de 15 dakika su banyosunda reaksiyona bırakılmış ve ardından agaroz jelde koşturulmuştur.

#### 3.4.6.1. Kesim Sonrasında DNA'nın Saflaştırılması

Restriksiyon enzimleriyle kesimden sonra, primerlerin, enzimlerin, tuzların ve nükleotidlerin ayrıştırılması için QIAquick Jel Ekstraksiyon Kiti kullanılmıştır.



Protokolun sonunda safaştırılmış DNA, 50 µl EB tamponu ile santrifüj kolonundan ayrılmıştır.

### 3.4.7. Ekleme Reaksiyonu (Ligasyon)

20 µl ligasyon reaksiyonu karışımının içeriği aşağıda verilenleri içermektedir:

- 10x Ligasyon tamponu : 2 µl
- Gen (insert) DNA (810 bç) : 1.5 µl (56.5 ng)
- İki kez kesilmiş vektör DNA (4263 bç) : 2.5 µl (100 ng)
- T4 DNA ligaz : 1 µl
- Steril dH<sub>2</sub>O : 13 µl

$$\text{gen miktarı(ng)} = 100 \text{ ng vektör} \times \frac{\text{genin büyüklüğü (bç)}}{\text{vektörün büyüklüğü (bç)}} \times \frac{3}{1} \quad (3.1)$$

Burada vektör-DNA molar oranı 1:3 olacak şekilde genin miktarı belirlenmiştir (Eşitlik 3.1). Kontrol reaksiyonu ise gen (insert) DNA dışında yukarıda verilen diğer tüm maddeleri içerecek şekilde oluşturulmuştur. Reaksiyon 16 st, 16°C'de yürütülmüştür. Daha sonra 65°C'de 10 dk tutularak reaksiyon durdurulmuştur. Ligasyon ürünü tuzdan arındırıldıktan sonra, gerektiğinde 5 µl'si *E. coli* transformasyon reaksiyonunda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

### 3.4.8. *E. coli*'nin CaCl<sub>2</sub> metodu ile Transformasyonu

Plazmidin çoğaltılması için kimyasal-kompetent *E. coli* hücreleri (DH5α) kullanılmıştır. Daha önceden hazırlanmış ve -80°C de saklanan (en fazla 1 ay) 50 µl hacminde kompetent hücre buz üstünde eritilmiş, içine 5 µl plazmid eklenmiştir. 90 sn süre ile 42°C'de ısıl şoklama sonucunda, plazmid DNA'nın hücrelerin içine alımı sağlanıp, daha sonra 2 dk. buz üzerinde bekletilmiştir. Hücrelerin üzerine 750 µl SOB ortamı eklenmiş ve 37°C'de 45 dk, 200 rpm'de çalkalandıktan sonra, 100-150 µl civarındaki transformasyon karışımı, seçici antibiyotik içeren katı ortama yayılarak ve 37°C'de 16 st inkübe edilmiştir.

### 3.4.9. DNA Dizi Analizlemesi

Sentezlenen plazmid dizisi, dizi analizi için tasarlanmış primerler kullanılarak dizinlenmiştir. 1 µg'lık safaştırılmış plazmid DNA, 1 µl'lik 4 µM dizi analizi için tasarlanmış primer eklenmiş ve son hacim saf su ile 18 µl'ye tamamlanmıştır. Elde

edilen veriler, ücretsiz yazılımlar, ApE plasmid Editor v2.0.45 [139] ve BLAST yazılımı [140] kullanılarak analizlenmiştir.

### 3.5. Kitin Deasetilaz Enzimi Üretimi

Elde edilen rekombinant plazmidler, *E. coli* CLM24 ve *E. coli* BL21(DE3) konak hücrelerine CaCl<sub>2</sub> metodu ile aktarılmıştır. Transformasyonun ardından hücreler, içerisinde plazmidlerine göre seçici antibiyotikleri (Kan, Amp, Cm veya Tp) içeren LB agar besi ortamına yayma yöntemiyle ekilmiş ve bir gece 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün üreyen hücrelerden birer koloni alarak, içerisinde gerekli antibiyotikler bulunan 5 ml'lik LB besi ortamına inoküle edilerek bir gece 37°C'de 200 rpm çalkalama hızında çoğaltılmıştır. Çoğalan hücreler, içinde 25 ml antibiyotikli ve glukozlu LB bulunan, 250 ml'lik steril erlenlere aktarılmış ve çalkalamalı inkübatörde 37°C'de, 200 rpm hızında çoğaltılmıştır. 600 nm'deki absorbansları 0.5-0.6 olduğunda, 25 µl 0.1 M IPTG ve bazı hücrelere ek olarak 250 µl, %20 L-Arabinoz ilave edilerek indüklenmiştir. Çalkalamalı inkübatörün sıcaklığı 30°C'ye düşürülerek 200 rpm'de 16 st üretime devam edilmiştir.

Üretimin sonunda hücreler, 4°C'de, 3000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. İntrasellüler enzim üreten hücrelerin peletleri 1X PBS tamponu ile süspansiyon haline getirilmiştir. Buz üzerindeki hücreler sonikatörde (30 sn, %20 çevrim, %100 güç) parçalanmıştır. Bu işlemden sonra 4°C'de, 13000 g'de 10 dakika tekrar santrifüj yapılmış ve süpernatantlar aktivite testi ve enzimatik deasetilasyon için kullanılmıştır.

### 3.6. Kimyasal Yolla Kitinden Kitosan Üretimi

Kitinden kimyasal yolla kitosan üretimi, kitindeki asetil gruplarının yüksek alkali çözeltileri kullanılarak uzaklaştırılmasına dayanmaktadır. Buna göre, kerevit ve karides kabuklarından ve *A. niger*'den ekstrakte edilen kitin tartılarak bir beher içerisinde konmuştur. Üzerine hazırlanan %50 (w/v) sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek farklı sıcaklıklarda ve sürelerde bekletilmiştir. Süre sonunda çözelti filtre kağıdı ile süzülerek, alkali çözeltinin uzaklaştırılması için saf su ile pH 7 oluncaya kadar yıkanmıştır. Ayrılan kitosan parçaları aseton ile de yıkanarak, 60°C'de etüvde kurumaya bırakılmıştır.

### 3.7. Enzim ile Kitinden Kitosan Üretimi

Enzimatik deasetilasyon işlemi için, 1X PBS tamponu içinde 5 mg kitin, elde edilen kitin deasetilaz enzimi ile son hacim 1 ml olacak şekilde hazırlanmış ve 50°C'de

inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon sonunda 100°C'de 10 dakika süre ile enzim deaktive edilmiştir. Santrifüjleme ve saf suyla yıkamadan sonra deasetillenmiş kitin kurutulup, FT-IR ile analizlenmiştir.

### **3.8. Analizler**

#### **3.8.1. Hücre Derişimi**

Hücre derişimi, UV-Vis Spektrofotometresi (Thermo Scientific, Genesys 10S, US) ile 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Sıvı ortamdan 1 mL örnek alınarak, dH<sub>2</sub>O ile OD<sub>600</sub>'ü 0.1-0.8 aralığında olacak şekilde seyreltilmiştir.

#### **3.8.2. DNA Derişimi**

Elde edilen nükleik asit derişimi, spektrofotometrede (Thermo Scientific, NanoDrop 1000, US), 2 µL hacminde örnek alınarak ölçülmüştür. Ayrıca, OD<sub>260/280</sub> ve OD<sub>260/230</sub> oranları ile de kirlilikleri kontrol edilmiştir.

#### **3.8.3. Enzim Aktivitesi**

Kitin deasetilaz aktivitesi, Kauss ve Bauch'un kolorimetrik yöntemi [133] ile belirlenmiştir. Reaksiyonlar 1.5 ml'lik eppendorf tüplerinde gerçekteştirilmiş olup, aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. 80 µl, 50 mM sodyum tetraborat tamponu (pH 8.5), 80 µl substrat (1 mg/ml) ve 40 µl enzim içeren 200 µl'lik karışım, 50°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
2. Reaksiyon, 200 µl %5 (w/v) potasyum hidrojen sülfat (KHSO<sub>4</sub>) çözeltilisi eklenerek durdurulmuştur.
3. Renk oluşumu için, 200 µl %5 (w/v) sodyum nitrit (NaNO<sub>2</sub>) eklenip, oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir.
4. 200 µl %12.5 (w/v) amonyum sülfamat (N<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO<sub>3</sub>) eklenip, 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. 200 µl %5 (w/v) 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone (MBTH) eklendikten sonra tüpler 3 dakika kaynayan su içinde tutulmuştur.
6. Tüpler çeşme suyu ile soğutulduktan sonra, 200 µl %0.5 (w/v) ferri klorür (FeCl<sub>3</sub>) eklenmiştir.
7. 30 dakika sonra, 650 nm dalga boyunda UV-spektrofotometrede absorbans ölçülmüştür.

Substrat çözeltilisi için kitosanın suda çözüner türevi hazırlanmiştir. Bunun için, 1 g kitosan 20 ml %2 (v/v) asetik asit içinde çözülmüştür. Daha sonra 60°C'deki su

banyosuna yerleştirilen çözelti üzerine, %4 (v/v) hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ilave edilerek 4 saat boyunca bu sıcaklıkta bekletilmiştir. Süre sonunda çözeltinin pH'ı %10 (w/v) NaOH çözeltisi ile 7'ye ayarlandıktan sonra çözünmeyen kısımlar filtrasyon ile uzaklaştırılmıştır. Çözeltiye, hacminin iki katı kadar etanol ilave edilerek çökelek oluşumu sağlanmıştır. Tekrar filtre edildikten sonra, sıvı kısım kristal parçacıklar elde etmek üzere bir gece boyunca oda sıcaklığında ve daha sonra 50°C'de etüvde bekletilerek kurutulmuştur.

Bir enzim ünitesi, 1 dakikada 1 µg glukozamin birimleri oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için glukozamin-HCl standart olarak kullanılmıştır. Glukozamin-HCl'nin seri dilüsyonları Çizelge 3.5'te verildiği şekilde hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.5.** Glukozamin-HCl standartının tüplere dağılımı

	<b>0 (kör)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Glukozamin-HCl (0.16 µg/µl)	-	10	20	30	40
dH <sub>2</sub> O (µl)	40	30	20	10	-

Standart çözeltiler için de yukarıda anlatılan adımlar uygulanmış ve kullanılan glukozamin derişimine karşı (µg/µl) karşı 650 nm'deki absorbans grafiği (Ek 3) çizilmiştir. Grafikten elde edilen eğim, enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Aktivite hesaplamasında kullanılan denklem, Eşitlik 3.2'te verilmektedir.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/ml)} = \frac{\left(\frac{A_{650}}{\text{Eğim}}\right)}{RS} \times EH \times \frac{SO}{\text{ÜH}} \quad (3.2)$$

Burada verilen EH, enzim hacmini (µl); ÜH, üretim hacmini (ml); SO, seyreltme oranını ve RS, reaksiyon süresini göstermektedir.

#### **3.8.4. Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR)**

FT-IR analizleri, Thermo Sceintific marka ve NICOLET 6700 model FT-IR cihazı kullanılarak, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Merkezi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Bu analizler elmas kristalinin kullanıldığı ATR (azalan tam yansıma) metodu ile gerçekleştirilmiştir. Bu metotta, incelenecek örnek kristal ile dıştan temas halindedir. Bu olayda ışık ara yüzeyden tam yansırken

içinde örnek bulunan tarafa birkaç mm kadar girmekte ve kristale yeniden geri dönüp yoluna devam etmektedir. Işığın örnekle etkileştiği her arayüzey bölgesinde absorpsiyon olanağı doğmakta ve böylece örneğin infrared spektrumu elde edilebilmektedir.

FT-IR analizleri, üretilen kitin ve kitosanların deasetilasyon derecelerinin hesaplanması amacıyla yapılmıştır. Analiz sonucu, 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında absorbans değerleri elde edilmiştir. Deasetilasyon derecesi (DD), deasetilasyon derecesine bağlı olarak değişen bir pik (karakteristik piki) ile deasetilasyon derecesinden bağımsız bir pikin (referans piki) karşılaştırılması ile belirlenmektedir. DD hesaplamalarında kullanılan absorpsiyon bantları, Çizelge 3.6'da verilmiştir.

**Çizelge 3.6.** DD hesaplamasında kullanılan absorpsiyon bantları

Dalga Sayısı ( $\text{cm}^{-1}$ )	Türü	Titreşim türü	Kullanılan Taban Çizgisi (Baseline)
3450	R	O-H gerilme	b1
2878	R	C-H gerilme	b2
1655	C	C=O gerilme (Amid I)	b3

\* R, referans pikini göstermektedir.

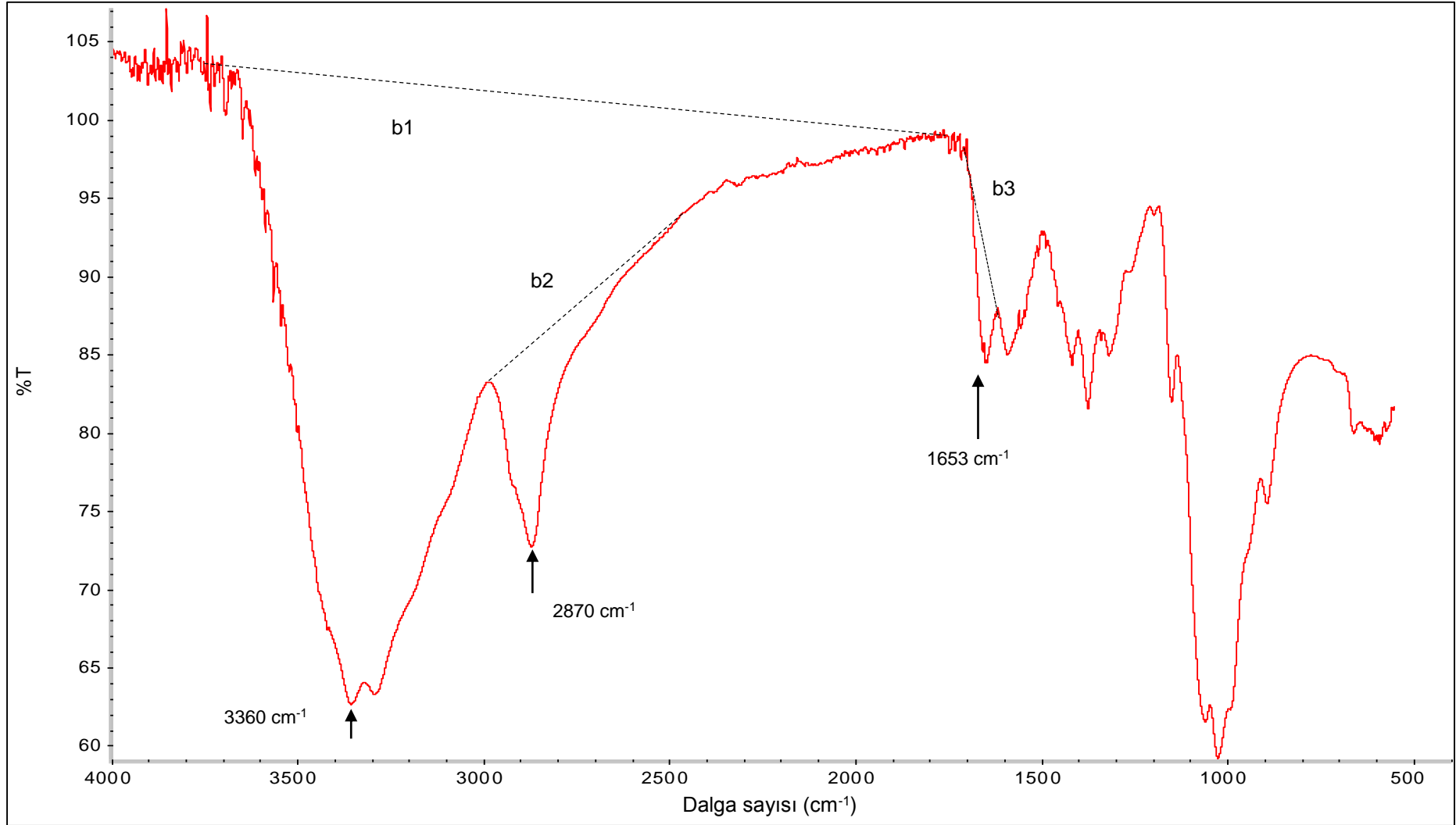
\*\* C, karakteristik piki göstermektedir.

\*\*\* bx, Şekil 3.3'te verilen taban çizgilerini göstermektedir.

Literatürde deasetilasyon derecesinin hesaplanması için oluşturulan birçok eşitlik bulunmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında kullanılan eşitlikler, Çizelge 3.7'de verilmiştir. Hesaplamalar yapılırken OMNIC yazılımı kullanılmıştır.

**Çizelge 3.7.** DD hesaplamasında kullanılan FT-IR eşitlikleri

Numara	DD (%)	Kaynak
1	$100 - 75.188A_{1655}/A_{3450}$	[24]
2	$97.624 - 22.08A_{1655}/A_{2878}$	[74]



Şekil 3.3. Deasetilasyon derecesi hesaplamalarında kullanılan taban çizgileri (baselines)

### **3.8.5. Termal Gravimetrik Analizler**

Termal gravimetrik analizler, SETERAM marka ve TG/DTA6300 model TGA cihazı kullanılarak, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Merkezi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Elde edilen kitin ve kitosanlarda sıcaklıkla meydana gelen ağırlık kayıplarını gözlemlemek amacıyla yapılan analiz, 5 mg alınarak cihaz içerisine yerleştirilen örneklerin azot gazı ortamında, 10°C/dak hızında 600 °C' ye kadar ısıtılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

## 4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında elde edilen deneysel bulgular, dört ana başlık altında incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, ilk olarak kerevit ve karides kabuklarından kitin ekstraksiyonu ve kimyasal deasetilasyon deneylerinin sonuçları tartışılmıştır. Daha sonra, *A. niger* fungusundan kitin ve kitosan elde etme deneylerinin bulguları değerlendirilmiştir. Her iki çalışma için de, elde edilen kitin ve kitosanların FT-IR analiz sonuçları tartışılmış ve bu analizden yola çıkarak kitosanların deasetilasyon dereceleri belirlenmiştir. Enzimatik deasetilasyon kısmında ise, öncelikle kitin deasetilaz enzimini üretmek amacıyla yapılan rekombinant *E. coli* tasarımı aşamaları incelenmiştir. Daha sonra, kitin deasetilaz üretimi ve aktivite tayini sonuçları tartışılmıştır. Son olarak da, kitin deasetilaz enzimi ile inkübasyona bırakılan kitin örneklerinin FT-IR analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

### 4.1. Kerevit ve Karides Kabuklarından Kitosan Üretimi

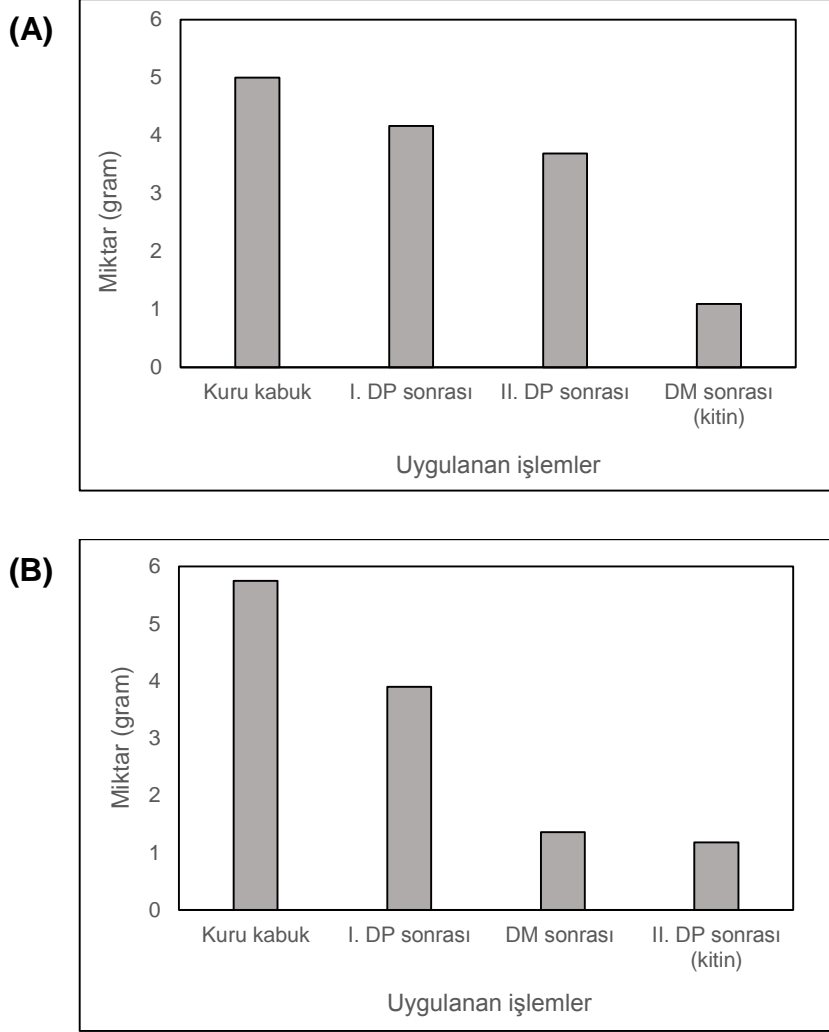
Kerevit ve karides kabuklarından kitosan üretimi için, öncelikle temin edilen kabukların yıkanması, kurutulması ve kimyasal maddelerin etkinliğini arttırmak için küçük parçalar haline getirilmesi işlemleri yapılmıştır. Daha sonra, kitin ekstraksiyonu için sırasıyla deproteinizasyon ve demineralizasyon; kitosan üretimi için ise deasetilasyon işlemleri uygulanmıştır. Çalışmanın bu kısmında, iki farklı kabuktan elde edilen kitin ve kitosanların verimleri, FT-IR analizleri ve deasetilasyon dereceleri karşılaştırılmıştır.

#### 4.1.1. Kerevit ve Karides Kabuğundan Kitin Ekstraksiyonu

Çalışmada ilk olarak kitinin, kerevit kabuklarından saflaştırılma aşamaları gerçekleştirilmiştir. Deproteinizasyon işlemi için, üzerine 1:10 (kuru kabuk:çözelti) oranında, %3.5 (w/v) NaOH çözeltisi ilave edilen kabuklar, 65°C'de 2 saat boyunca bekletilmiştir. Demineralizasyonda ise, üzerine 1:15 (kuru kabuk:çözelti) oranında 1 M HCl çözeltisi eklenen deproteinize olmuş kabuklar, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir.

Kerevit kabuğundan kitin ekstraksiyonu, iki kez gerçekleştirilmiş olup; Şekil 4.1'te kabuklara uygulanan deproteinizasyon ve demineralizasyon işlemleri sonucunda, elde edilen miktarlar verilmiştir.



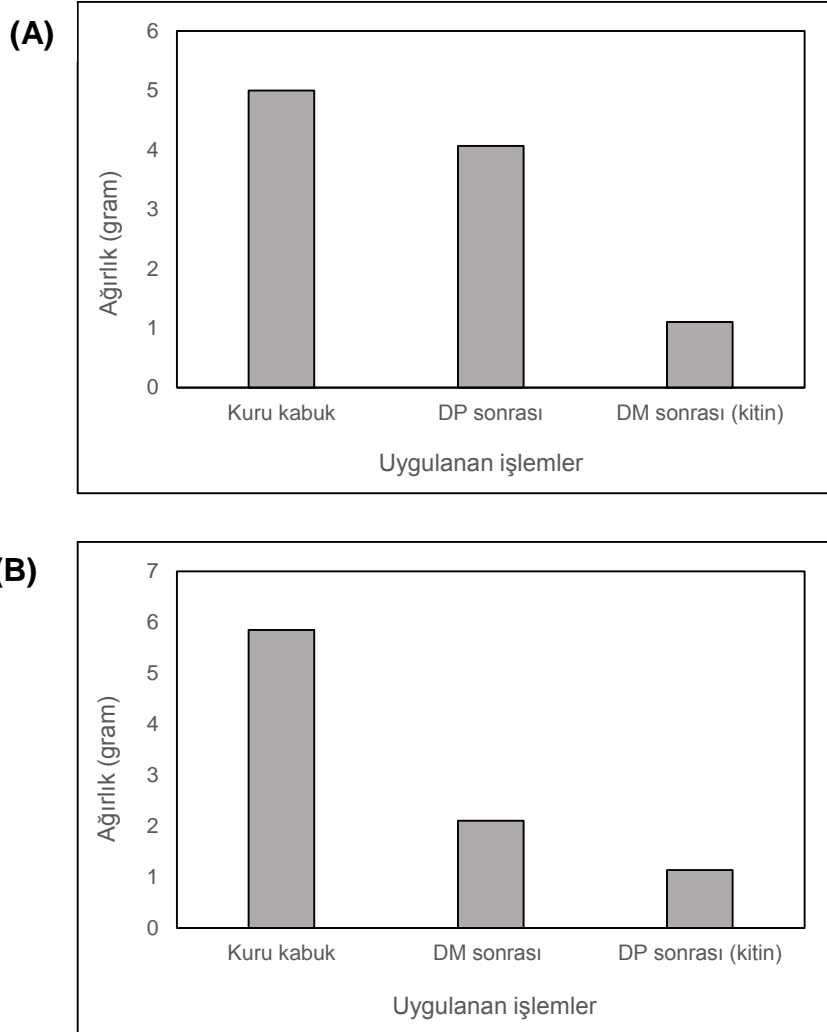


**Şekil 4.1.** Kerevit kabuğuna uygulanan işlemler sonucunda elde edilen miktarlar  
**(A).** İşlem sırası: DP-DP-DM; **(B).** İşlem sırası: DP-DM-DP  
(DP: Deproteinizasyon; DM: Demineralizasyon)

Şekil 4.1.A incelendiğinde, 5 g kuru kabuk ile başlanan proseste, birinci deproteinizasyon sonucunda 4.2 g kabuk kaldığı, yani proteinlerin %16'sının uzaklaştırıldığı görülmektedir. Bu uzaklaştırmanın yeterli olmadığı düşünülmüş, aynı koşullarda ikinci bir deproteinizasyon işlemi uygulanmıştır. Bunun sonucunda, 3.69 g kabuk elde edilmiş ve kabuğun protein içeriği %26 olarak belirlenmiştir. Demineralizasyon işlemi sonucunda ise, kabuğun mineral içeriği %52 olarak bulunmuştur. Proses sonucunda 5 g kabuktan 1.09 g kitin elde edilmiş ve kabuğun %22 oranında kitin içerdiği belirlenmiştir. Şekil 4.1.B'de ise 5.75 g kerevit kabuğundan kalan miktarlar verilmektedir. Bu proseste de demineralizasyon sonrası tekrar deproteinizasyon uygulanmıştır ve gerçekleşen %3'lük bir kayıpla proteinlerin ilk aşamada tamamen uzaklaştırılmadığı görülmüştür. İkinci kerevit kabuğundan uzaklaştırılan protein ve mineral içerikleri %35 ve %44; kazanılan kitin içeriği %21

olarak bulunmuştur. İki kerevit kabuğunda da hemen hemen aynı oranlarda (%22 ve %21) kitin elde edilmiştir. Literatürde tez çalışması ile aynı koşullarda yapılan çalışmalarda, kerevit kabuklarının kitin içerikleri %23.5 [76] ve %13.2 [61] olarak bulunmuştur. Daha önceden de bahsedildiği gibi kitin içerikleri, canlılığın cinsi, yaşı gibi birçok parametreye göre değişkenlik gösterdiği için bu değerler ile tez çalışmasında bulunan değerler arasında tam bir karşılaştırma yapılamamaktadır. Ancak genel olarak, %13-42 oranında kitin içeriğinin bulunması beklenmiştir ve bulunan değerlerin bu aralıkta olduğu görülmektedir.

Kitin ekstraksiyonu, karides kabukları için de iki kez yapılmıştır. Birincisinde, kerevit kabukları ile aynı koşullar ve işlem sırası uygulanırken (Şekil 4.2.A); ikincisinde işlem sırası değiştirilerek önce demineralizasyon daha sonra deproteinizasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2.B).



**Şekil 4.2.** Karides kabuğuna uygulanan işlemler sonucunda elde edilen miktarlar **(A)**. İşlem sırası: DP-DM; **(B)**. İşlem sırası: DM-DP (DP: Deproteinizasyon; DM: Demineralizasyon)

Şekil 4.2.A'ya göre, kitin elde etmek için kullanılan 5 g karides kabuğuna önce protein giderme daha sonra mineral giderme işlemleri uygulandığında, uzaklaştırılan protein ve mineral içerikleri %18.7 ve %59.2; kazanılan kitin içeriği ise %22 olarak bulunmuştur. İşlem sırası değiştirildiğinde ise, 5.85 g kabuğun protein, mineral ve kitin içerikleri sırasıyla %16.5, %64 ve %19.4 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2.B). Deproteinizasyon ve demineralizasyon işlemlerinin sırasının değiştirilmesi durumunda da, kitin kazanım verimlerinin birbirine çok yakın olmakla birlikte, %3 daha düşük olduğu görülmektedir. Hajji ve arkadaşları tarafından yapılan, önce demineralizasyon daha sonra deproteinizasyonun yapıldığı çalışmada, karides kabuklarından ekstrakte edilen kitin içeriği %20 olarak bulunmuştur [75] ve bu değer tez çalışmasında elde edilen değerlerle uyumlu olduğu görülmektedir.

Çalışmanın son kısmında, kerevit kabuklarından elde edilen kitinler aseton ve etanol ile; karides kabuklarından elde edilen kitinler ise 9:1 oranında hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):%33 HCl çözeltisi ile bir gece boyunca muamele edilerek renk giderimi yapılmıştır.

#### 4.1.2. Kimyasal Yolla Kitinden Kitosan Üretimi

Deasetilasyon işlemi için, kerevit ve karides kabuklarından ekstrakte edilen kitinler, 1:10 (kitin:çözelti) oranında, %50'lik (w/v) NaOH çözeltisi ile farklı koşullarda (otoklav, 121°C, 20 dakika ve etüv, 120 °C, 4 saat) muamele edilmiştir. Bu koşullara göre elde edilen kitosan miktarları ve verimleri Çizelge 4.1'te verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Deasetilasyon koşullarına göre elde edilen kitosan miktarları ve verimi

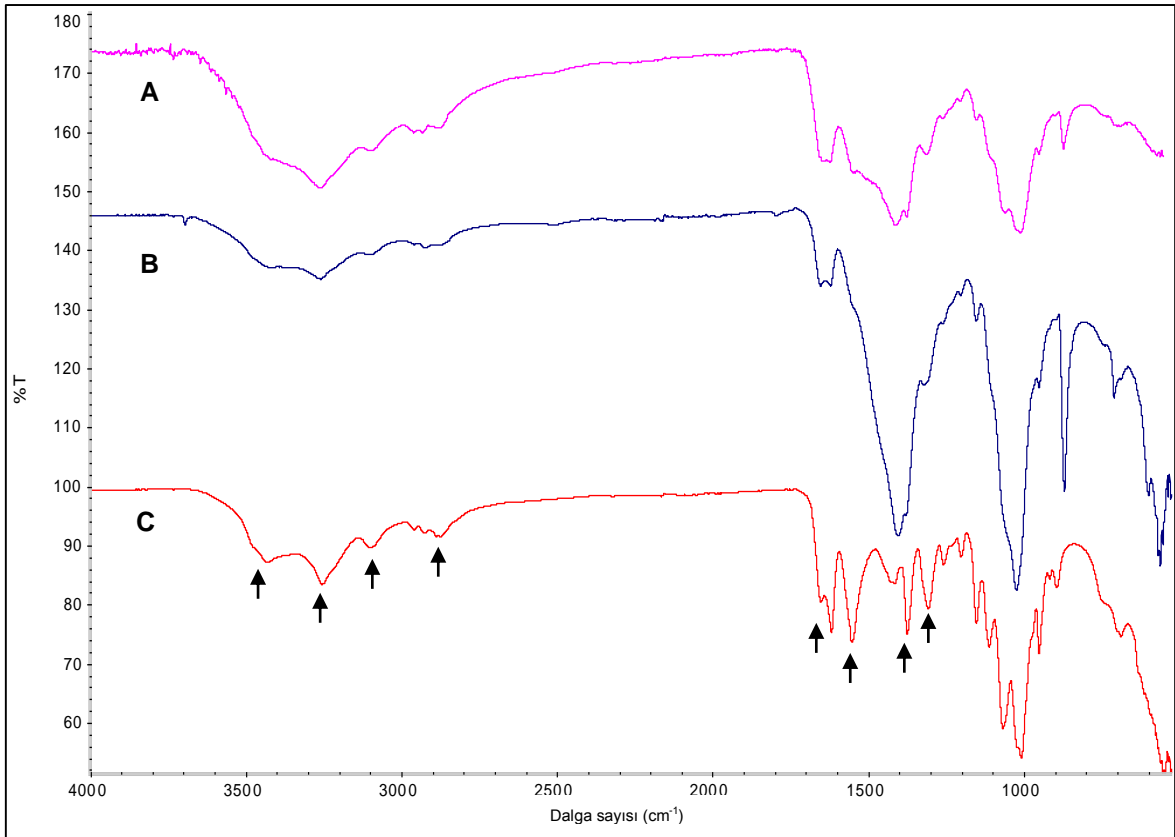
Kitin Kaynağı	Deasetilasyon koşulları	Kabuk Miktarı (g)	Kitosan Miktarı (g)	Kabuktan kitosan üretim yüzdesi (%)
Kerevit I	120°C, 4 st	5.00	0.35	7.0
Kerevit II	121°C, 20 dak	5.75	0.70	12.2
Karides I	121°C, 20 dak	5.00	0.90	18.0
Karides II	120°C, 4 st	5.85	0.40	6.8

Çizelge 4.1'e göre, otoklavda gerçekleştirilen deasetilasyon proseslerinde gerek karides gerekse kerevitten kitosan üretim yüzdelerinin, daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun sebebinin, kitinin yüksek sıcaklıkta daha uzun süre durmasından dolayı bozunmaya uğrayabileceği ya da deproteinizasyon işlemi sırasında uzaklaştırılmadan kalan protein kalıntılarının NaOH ortamında çözünerek kütle kaybına sebep olabileceği düşünülmektedir. Hajji ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, karidesten kitosan üretim verimi %14.9 olarak

verilmekte olup [75], bu çalışmada otoklavda elde edilen verimin az da olsa yüksek olduğu görülmektedir. Deasetilasyon koşullarının temel etkisi, FT-IR analizi sonucu hesaplanan deasetilasyon derecelerine göre bir sonraki bölümde ayrıca değerlendirilmiştir.

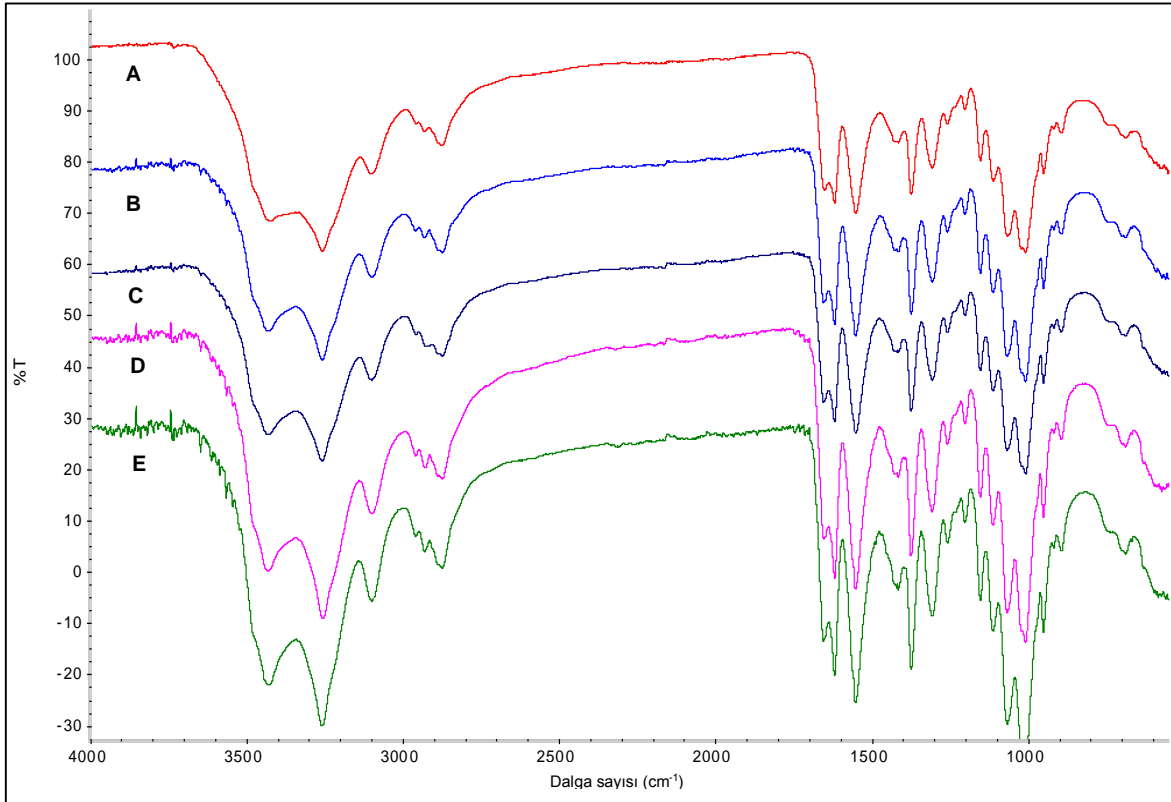
#### 4.1.2.1. FT-IR Analizi ve Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi

Karides kabuğundan kitin ekstraksiyonu aşamalarında elde edilen FT-IR pikleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Burada, C spektrumunda protein ve minerallerin uzaklaştırılması sonucunda, kitini karakterize eden piklerin ortaya çıktığı görülmektedir. Spektrumda gözlenen,  $3436\text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bandı O-H, N-H ve molekül içi hidrojen bağlarının gerilme titreşimlerini içermektedir.  $1655$ ,  $1553$  ve  $1310\text{ cm}^{-1}$  deki absorpsiyon bantları kitindeki asetamido gruplarının karakteristik pikleridir ve sırasıyla amid I, II ve III bantları olarak rapor edilmiştir [141].  $3260$  ve  $3100\text{ cm}^{-1}$ 'deki bantlar sırasıyla moleküller arası hidrojen bağlarındaki (CO---HN) ve molekül içi NH gruplarındaki titreşimleri,  $1377\text{ cm}^{-1}$ 'deki keskin pik  $\text{CH}_3$  gruplarındaki simetrik eğilmeyi ve  $2877\text{ cm}^{-1}$ 'deki ise C-H bağlarındaki gerilmeyi göstermektedir.



**Şekil 4.3.** Kitin ekstraksiyonu aşamalarında elde edilen FT-IR spektrumları (A:Karides kabuğu; B: Deproteinizasyon sonrası; C: Demineralizasyon sonrası)

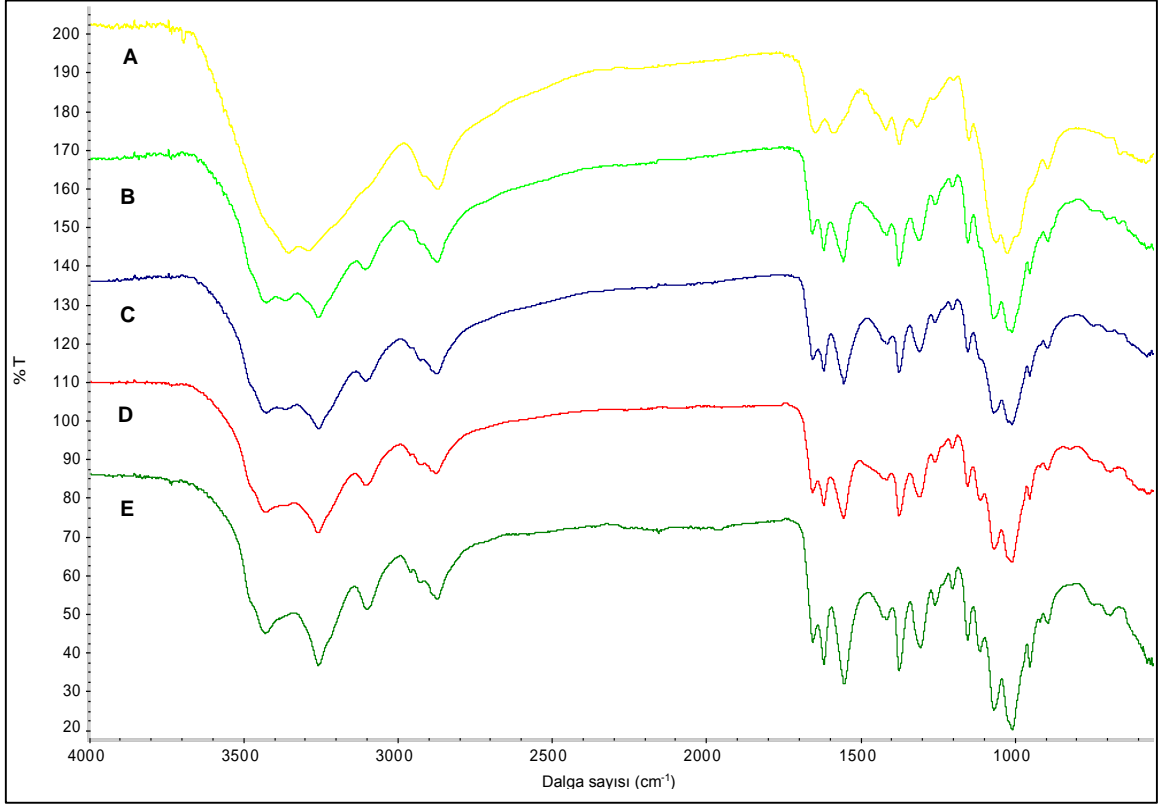
Şekil 4.4'te kerevit ve karides kabuklarından ekstrakte edilmiş kitinlerin ve ticari kitinin FT-IR spektrumları verilmiştir. Elde edilen spektrumlar incelendiğinde, yukarıda bahsedilen piklerin elde edildiği ve piklerin ticari kitin ve birbirleri ile birebir örtüşükleri görülmektedir. Spektrumlarda  $1655\text{ cm}^{-1}$  ve  $1620\text{ cm}^{-1}$ 'de sırasıyla moleküller arası (CO---HN) ve molekül içi (CO---HOCH<sub>2</sub>) hidrojen bağlarını gösteren iki ayrı pik gözlemlenmekte olup, bu pikler kitinin alfa yapısında olduğunu ispat etmektedir. Literatürde alfa yapısındaki kitinde  $1662$  ve  $1630\text{ cm}^{-1}$ 'de iki ayrı pik oluşurken, beta yapısındaki kitinde  $1659\text{ cm}^{-1}$ 'de tek bir absorpsiyon bandı görüldüğü rapor edilmiştir [142].



**Şekil 4.4.** Elde edilen kitinlerin FT-IR spektrumları (A: Ticari kitin; B: Kerevit kitin I; C: Kerevit kitin II; D: Karides kitin I; E: Karides kitin II)

Şekil 4.5'te ticari kitosan ve etüvde  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, 4 saat (B ve E) ve otoklavda  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, 20 dakikada (C ve D) gerçekleştirilen kimyasal deasetilasyon sonucu elde edilen FT-IR spektrumları verilmiştir. Kitinden kitosana dönüşüm sonrasında, sekonder amid gruplarıyla ilişkili olan  $3443$ - $3265$ - $3105$ - $1655$ - $1554$ - $1315$  ve  $1261\text{ cm}^{-1}$  dalga sayılarındaki ve C-H bağlarıyla ilgili  $2962$ - $2934$ - $2890$ - $1380$ - $1205\text{ cm}^{-1}$  dalga

sayılarındaki bant şiddetlerinin azalması; 1596  $\text{cm}^{-1}$ 'de primer amidle ilişkili pikin ortaya çıkması beklenmektedir [141].



**Şekil 4.5.** Elde edilen kitosanların FT-IR spektrumları (A: Ticari kitosan; B: Kerevit kitosan I; C: Kerevit kitosan II; D: Karides kitosan I; E: Karides kitosan II)

Şekil 4.5 incelendiğinde, 3436 ve 3260  $\text{cm}^{-1}$ 'deki iki ayrı pikin, geniş bir pike dönüştüğü ancak bu dönüşüm E spektrumunda diğerlerine göre daha az olduğu görülmektedir. Elde edilen kitosanların FT-IR spektrumları birbirleri ve ticari kitosan ile uyumlu olmakla birlikte, ticari kitosanda 3100  $\text{cm}^{-1}$ 'de kaybolan absorbans bandının, bu çalışmada üretilen kitosanların spektrumlarında görülmesi açısından farklılık göstermektedir. Ancak, Paulino ve arkadaşları [143], Di Mario ve arkadaşları [87] tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen kitosanların FT-IR spektrumlarında da aynı pik gözlemlenmektedir; bu da elde edilen sonuçların literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Literatürde deasetilasyon derecesini hesaplamak için, farklı piklerin kullanıldığı birçok FT-IR eşitliği bulunmakta olup [141], her birinden aynı sonuç elde edilememektedir. Bu açıdan, bu çalışmada deasetilasyon dereceleri iki farklı yöntem ile hesaplanmıştır. Çizelge 4.2'de, Çizelge 3.6 ve 3.7'de verilen taban çizgileri ve eşitlikler yardımıyla hesaplanan deasetilasyon dereceleri verilmiştir.

#### Çizelge 4.2. FT-IR analizi ile hesaplanan deasetilasyon dereceleri

Örnek	DD <sub>1</sub> (%)	DD <sub>2</sub> (%)
Ticari	88.5	85.1
Kerevit I	77.0	74.8
Kerevit II	73.1	69.4
Karides I	71.9	70.4
Karides II	62.4	63.6

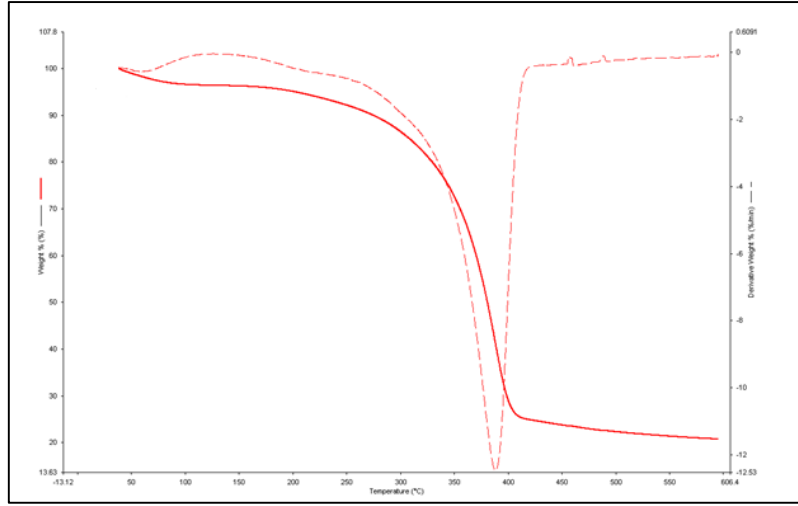
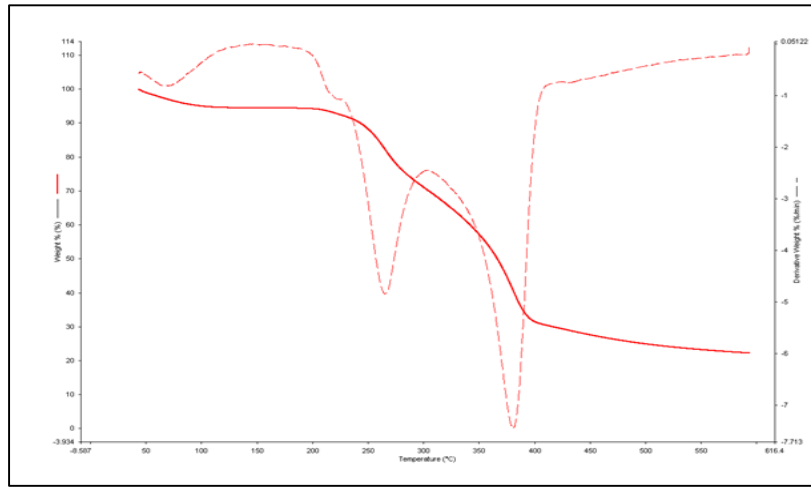
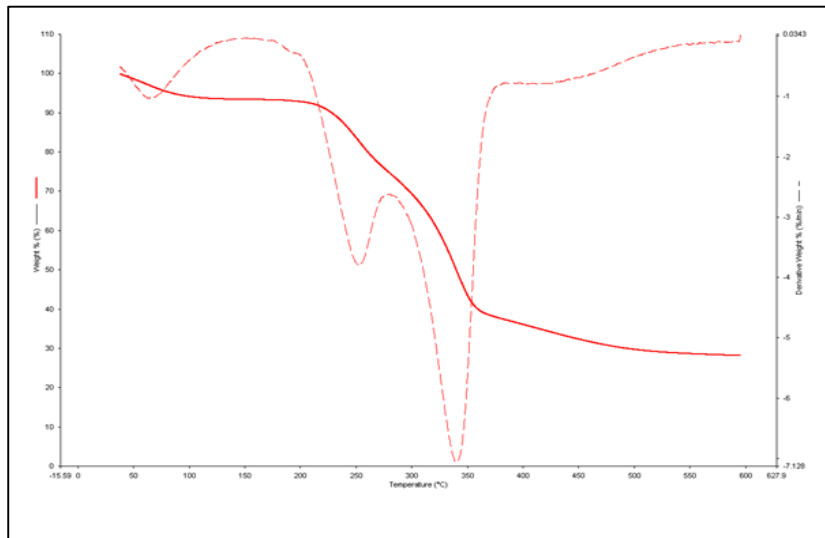
\* DD: Deasetilasyon derecesi

Çizelge 4.2'den görüldüğü gibi iki farklı referans pikin ( $3450\text{ cm}^{-1}$  ve  $2877\text{ cm}^{-1}$ ) kullanıldığı eşitlikler sonucu birbirine yakın değerler elde edilmiştir. Kerevit ve karides olarak karşılaştırıldığında da, FT-IR analizi sonucu düşük çıkan karides II örneği hariç, diğer örneklerin deasetilasyon derecelerinin birbirlerine yakın olduğu görülmektedir. Sonuçlardan da görüldüğü gibi, deasetilasyon işleminin otoklavda  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika ya da etüvde  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 4 saat yapılması deasetilasyon derecesi açısından çok büyük farklılık oluşturmamıştır. Bu nedenle, deasetilasyon işleminin süre açısından otoklavda yapılması önerilmektedir.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, Martin ve arkadaşları tarafından %50 (w/v) NaOH çözeltisi ile  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1:7 (katı:çözelti) oranında yapılan işlemde 2 saat süreyle yapıldığında %73.7; 4 saat süreyle yapıldığında %74.1 değerinde deasetilasyon derecesi bulunmuştur [74]. Tez çalışmasında bulunan değerlerin (Çizelge 4.2), bu değerler ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hajji ve arkadaşları tarafından, deasetilasyon işleminin, 12.5 M NaOH ile  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1:10 oranında, 4 saat boyunca yapıldığı çalışmada ise deasetilasyon derecesi %88 olarak bulunmuştur [75]. Kimyasal deasetilasyon işleminin, sıcaklık, deasetilasyon süresi, kullanılan NaOH derişimi ve katı:NaOH oranı, çalışılan ortam gibi birçok parametreye bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Bu tez çalışması kapsamında yapılan koşullarla %70-75 deasetilasyon derecesinde kitosan elde edilmekte olup; bu değeri arttırmak için birçok parametreyi içeren geniş kapsamlı bir optimizasyon çalışması yapılması gerekmektedir.

#### 4.1.2.2. Termal Gravimetrik Analizler

Kimyasal işlemler sonucu elde edilen kitin ve kitosanın termal gravimetrik analiz sonuçları Şekil 4.6'da verilmiştir.

**A****B****C**

**Şekil 4.6.** Termal gravimetrik analiz sonuçları (A: karides kitin; B: kerevit kitosan; C: karides kitosan)



Karidesten elde edilen kitinin TGA grafiğine (Şekil 4.6.A) bakıldığında, 60–100°C ve 350–400°C’de olmak üzere iki ağırlık kaybı görülmektedir. 60-100°C arasındaki %3.7’lik kayıp, suyun buharlaşmasından kaynaklanmaktadır. İkinci ağırlık kaybının ise kitin molekülünün sakkarit yapısının bozunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Şekil incelendiğinde, 550°C’den sonra ağırlık kaybının durmaya başladığı görülmektedir. Bu noktadan sonra bozunmadan kalan maddenin demineralizasyon sırasında uzaklaştırılmadan kalan mineral içeriği olduğu düşünülmektedir ve bu da yaklaşık %24.6 oranına denk gelmektedir.

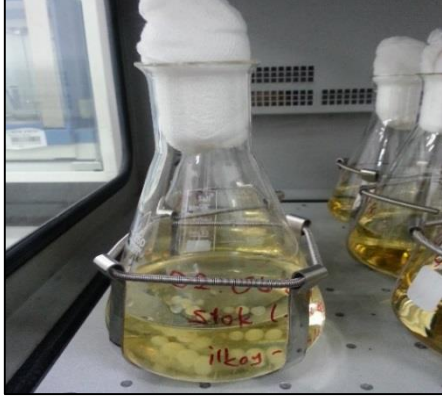
Kerevit ve karides kabuklarından elde edilen kitosanların TGA grafiklerine (Şekil 4.6.B ve Şekil 4.6.C) bakıldığında ise, üç ağırlık kaybı görülmektedir. Birinci (60-100°C) ve üçüncü (350-400°C) pikler, kitinin TGA grafiğinde görülen piklere benzerlik göstermektedir. İkinci kütle kaybı ise kitinde gözlemlenen bozunma sıcaklığından daha düşük bir sıcaklıkta (250-270°C) gerçekleşmekte olup, bu bozunmanın deasetillenmiş moleküllerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum kitosanın termal stabilitesinin düşük olduğunu göstermektedir. Elde edilen grafikler, ticari kitosanın TGA grafiği (Ek 6) ile karşılaştırıldığında ticari kitosanda su kaybından (70-100°C) ve deasetillenmiş grupların (250-300°C) kaybından kaynaklanan iki pik görülmektedir ve bu da çalışmadan elde edilen grafikler ile uyumludur. Literatüre bakıldığında da, Paulino ve arkadaşları tarafından üretilen kitosanın TGA grafiği [143] ile çok benzer oldukları görülmektedir.

#### **4.2. A. *niger*’den Kitin ve Kitosan Ekstraksiyonu**

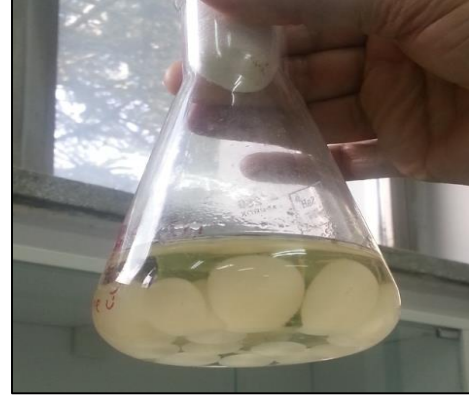
*A. niger*’den kitin ve kitosan ekstraksiyonu, Şekil 3.1’de verilen akış şemasına göre gerçekleştirilmiştir.

##### **4.2.1. A. *niger*’in Çoğaltılması**

*Aspergillus niger* küf mantarının çoğaltılması için, Çizelge 3.1’te verilen, USDA tarafından önerilen besi ortamı seçilmiştir. Mikroorganizmaların besi ortamına aşılmasının 2. gününde bulanıklık gözlemlenmiştir ve 3. günden itibaren biyokütle oluşmaya başlamıştır (Şekil 4.7). Kitin ve kitosanın ekstraksiyonu için 8 gün çoğaltmaları gözlemlenmiş ve 8. günde maksimum kuru biyokütle ağırlığına (9.3 g/l) ulaşılmıştır (Şekil 4.8).



**Şekil 4.7.** *A. niger*'in 3. gün sonunda çoğalması

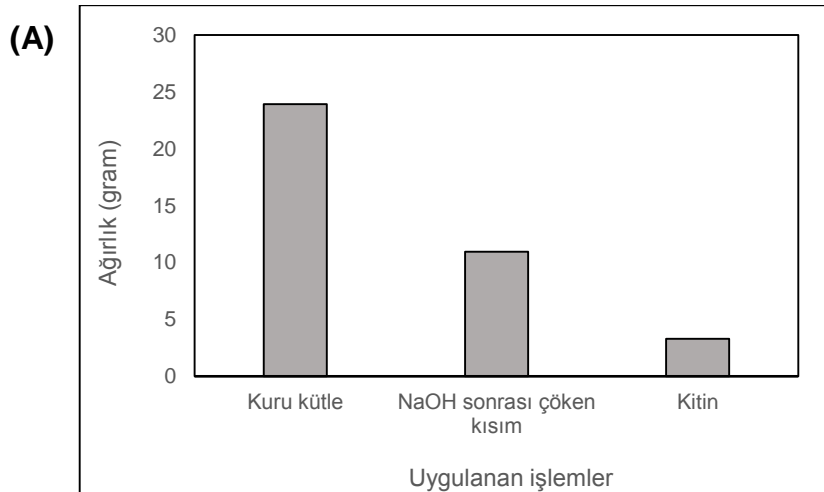


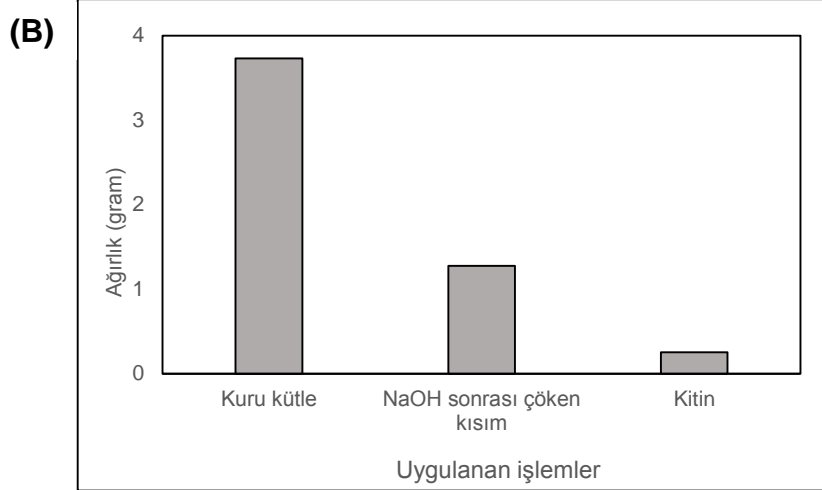
**Şekil 4.8.** *A. niger*'in 8. gün sonunda çoğalması

Literatürde *A. niger*'den kitin ve kitosan elde etmek amacıyla yapılan çalışmalardan, Pochanavanich ve arkadaşları tarafından, patates dekstroz (PDB) üreme ortamında yapılan çalışmada maksimum biyokütle olarak 6. Günde 9 g/l kuru biyokütle [66]; Wu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise YPD (%2 gukoz, %0.2 maya özütü, %1 pepton) besi ortamında 9. günde 6.5 g/l kuru biyokütle [6] elde edilmiştir. Tez çalışması kapsamında seçilen besi ortamında elde edilen biyokütlenin (9.3 g/l), YPD ortamından elde edilen değere göre daha iyi olduğu; patates dekstroz üreme ortamından elde edilen değerle de uyumlu olduğu ancak fungusların PDB ortamında daha hızlı çoğaldıkları (6 gün) görülmektedir.

#### 4.2.2. Kitin ve Kitosan Verimi

Şekil 4.9'da, -80°C'de saklanan örneklerden çoğaltılan funguslarla (Şekil 4.9.A), buzdolabında bekletilen ortamlardan çoğaltılan funguslar (Şekil 4.9.B) için, kuru biyokütleden başlanarak her aşamada elde edilen kuru ağırlık değerleri verilmiştir.





**Şekil 4.9.** *Aspergillus niger* biyokütlesine uygulanan işlemler sonucunda elde edilen miktarlar

Şekil 4.9.A'ya göre, 23.92 g *A. niger* biyokütlesinden NaOH ile muameleden sonra, 10.94 g alkali çözünmeyen kısım kalmış olup, bu kısım toplam biyokütlenin %45.74'ünü oluşturmaktadır. Asetik asit ile muameleden sonra elde edilen 3.28 g kitin ise biyokütlenin %13.73'ünü oluşturmaktadır. Şekil 4.9.B'de ise, 3.73 g başlanan biyokütleden %34.23 alkali çözünmeyen kısım ve %6.8 kitin elde edilmiştir. Elde edilen kitosan verimlerindeki iki kat farkın, üreme koşullarının etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Her iki biyokütleden elde edilen kitosan miktarı ise çok düşüktür ancak literatürde yer alan çalışmalarda da *A. niger* fungusundan az miktarda kitosan elde edildiği rapor edilmekte olup elde edilen değerlerle uyum içerisindedir [6].

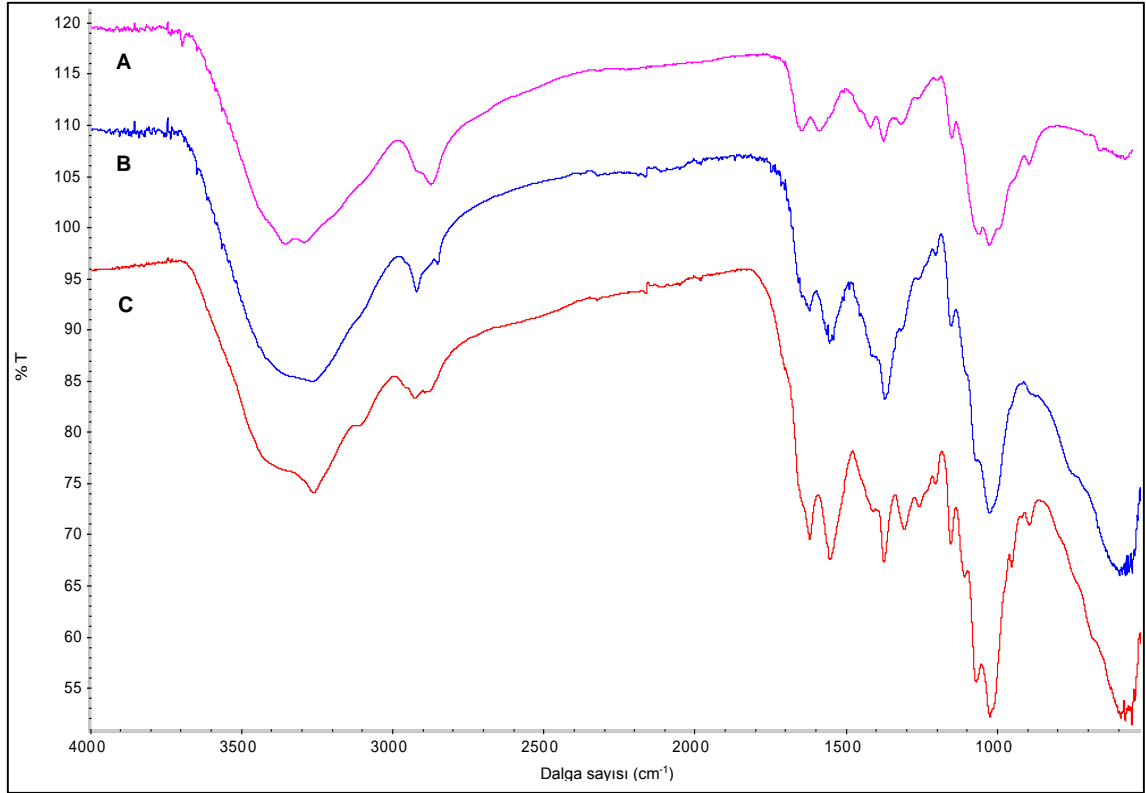
#### 4.2.3. Kimyasal Yolla Kitinden Kitosan Üretimi

*Aspergillus niger* fungusundan ekstrakte edilen kitinin üzerine 1:10 (katı:çözücü) oranında %50 (w/v) NaOH çözeltisi ilave edilerek, otoklavda 121°C'de, 20 dakikada kimyasal deasetilasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kitosanların FT-IR ve termal gravimetrik analiz sonuçları ve deasetilasyon dereceleri aşağıda tartışılmıştır.

##### 4.2.3.1. FT-IR Analizi ve Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi

Bu kısımda ilk olarak, *A. niger* fungusundan kitosan ekstraksiyonu prosesinin ilk aşaması olan 1 M NaOH ile protein giderimi işlemi, 121°C'de 20 dakikada otoklavda ve 90°C'de 2 saat su banyosunda denenmiştir. İki farklı işlem sonucu elde edilen kitosanların FT-IR spektrumları Şekil 4.10'da verilmiş olup elde edilen spektrumların

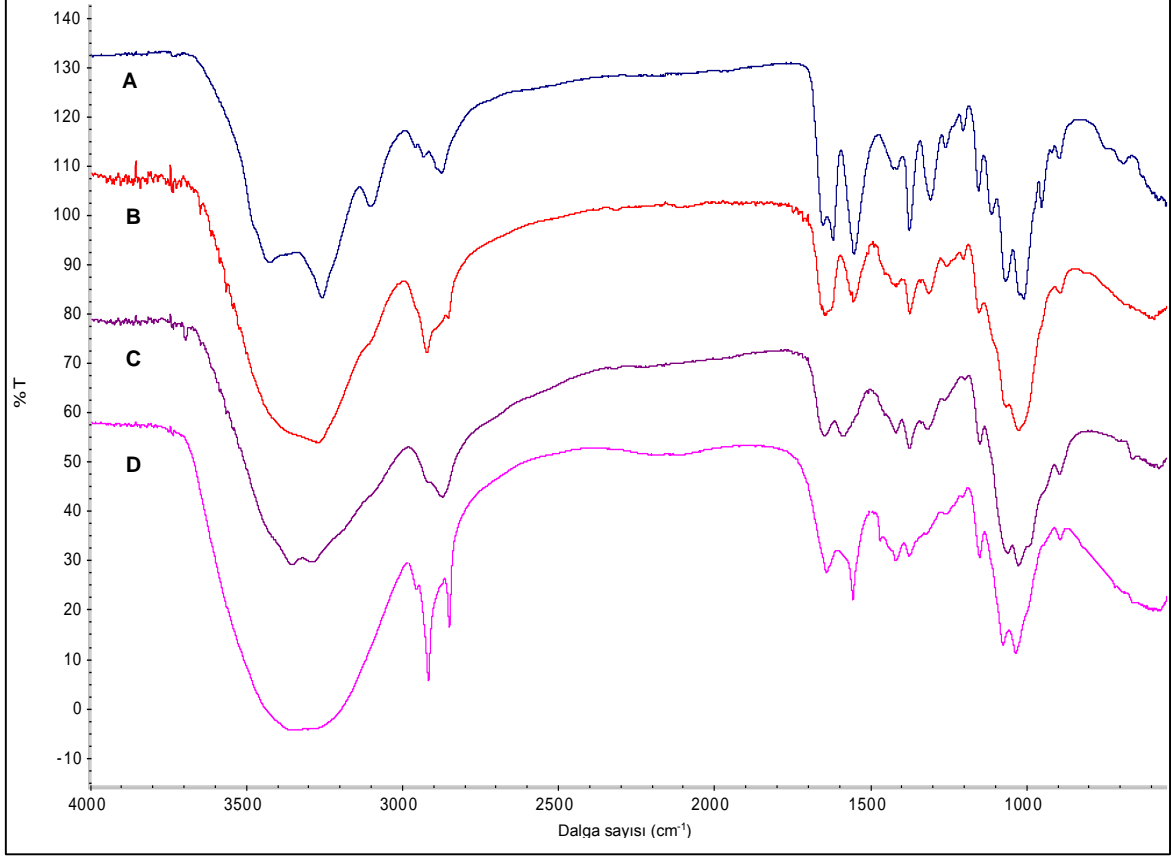
birbirleri ve ticari kitosan ile uyumlu oldukları görünmektedir. Ancak, deasetilasyon derecesini hesaplamak için piklerin oranına bakıldığında, otoklavda gerçekleştirilen işlem sonucu %74 deasetilasyon derecesinde kitosan; 90°C'de gerçekleştirilen işlem sonucu ise %48 deasetilasyon derecesinde kitin elde edilebilmiştir. Protein giderme işleminin, NaOH ile yapılmasından dolayı bu işlemde aynı zamanda deasetilasyonun da gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Bu açıdan bu aşamadaki NaOH derişimi, sıcaklığı ve süresi önemlidir.



**Şekil 4.10.** *A. niger* fungusundan elde edilen kitosanın FT-IR analizi (A:Ticari kitosan; B: 1 M NaOH ile muamele - 121°C, 20 dak; C: 1 M NaOH ile muamele - 90°C 2 saat)

*A. niger* fungusuna yapılan ekstraksiyon prosesinde, kitine göre çok az miktarda kitosan elde edildiği görünmektedir. Bu açıdan bu fungusun, kabuklular gibi bir kitin kaynağı olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla asetik asitle çözünmeden kalan kitin, 121°C'de 20 dakika otoklavda, %50 NaOH ile muamele edilmiştir. Deasetilasyon işlemi öncesi elde edilen kitin ve deasetilasyon sonucu elde edilen kitosana ait FT-IR spektrumları Şekil 4.11'de verilmiştir. *A. niger*'den elde edilen kitinin spektrumu incelendiğinde, kabuklulardan elde edilen kitin gibi 3265 ve 3100 cm<sup>-1</sup> dalğa sayılarında pik gözlemlenememiştir. Di Mario ve arkadaşları

tarafından yapılan çalışmada da, *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* gibi funguslardan elde edilen kitinlerde bu pikin gözlemlenemediği rapor edilmiştir [87]. Şekil 4.11'de elde edilen kitosan spektrumu incelendiğinde de, ticari kitosan ile örtüştüğü görülmektedir.

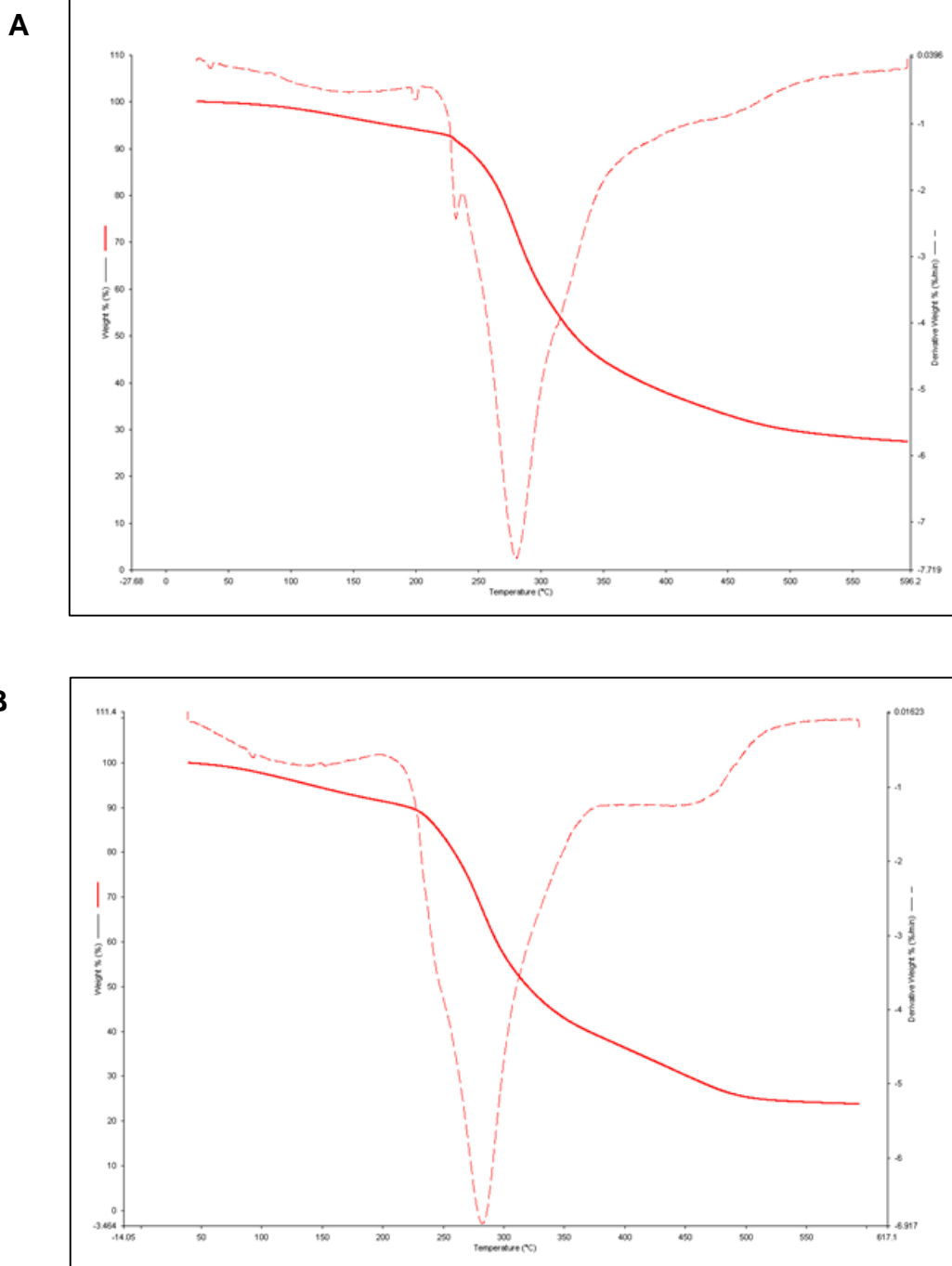


**Şekil 4.11.** *A. niger*'den elde edilen kitin ve kimyasal deasetilasyonla elde edilen kitosanın FT-IR spektrumları (A: Ticari kitin; B: *A. niger* kitin; C: Ticari kitosan; D: *A. niger* kitininin kimyasal deasetilasyonu ile elde edilen kitosan)

Kimyasal deasetilasyon sonucu elde edilen kitosanın deasetilasyon derecesi, Çizelge 3.7'deki 1. Eşitlik ile hesaplanmış ve %86 olarak bulunmuştur. Bu değer yüksek çıkmasına, hem protein giderme işlemi için hem de deasetilasyon işlemi için iki defa yüksek sıcaklıkta NaOH ile muamele edilmesinin etkisi olduğu düşünülmektedir. *A. niger* ile yapılan çalışmalara bakıldığında, Cai ve arkadaşları tarafından *A. niger*'den elde edilen kitine, %50 NaOH ile 125°C'de 2 saat kimyasal deasetilasyon işlemi uygulandığında %76.8 deasetilasyon derecesinde kitosan elde edildiği rapor edilmiştir [144]. Buna göre, fungustan elde edilen kitinle de kabuklularda olduğu gibi otoklavda yapılan işlem sonucunda, daha yüksek deasetilasyon derecesinde kitosan elde edilebileceği belirlenmiştir.

#### 4.2.3.2. Termal Gravimetrik Analizler

*A. niger* fungusundan ekstrakte edilen kitosanın ve ekstrakte edilen kitinin kimyasal deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosanın termal gravimetrik analiz sonuçları Şekil 4.12'de verilmiştir.



**Şekil 4.12.** Termal gravimetrik analiz sonuçları (A: *A. niger* kitosan; B: Kimyasal deasetillenmiş *A. niger* kitin)

Şekil 4.12 incelendiğinde *A. niger* fungusundan iki farklı şekilde elde edilen kitosanlarda 250-300°C'de ağırlık kaybı gerçekleştiği görülmektedir. Ayrıca fungusdan elde edilen kitosanın termal stabilitesinin kitine göre düşük olduğu gözlemlenmiştir.

### 4.3. CDA Üretimi için Rekombinant *E.coli* Tasarımı

Çalışmanın bu kısmında, kitin deasetilaz enzimini üreten rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) ve *E. coli* CLM24 hücrelerini elde etmek amacıyla ekspresyon sistemleri tasarlanmış ve uygulanan genetik mühendisliği tekniklerinin sonuçları tartışılmıştır.

#### 4.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile CDA2 Geninin Çoğaltılması

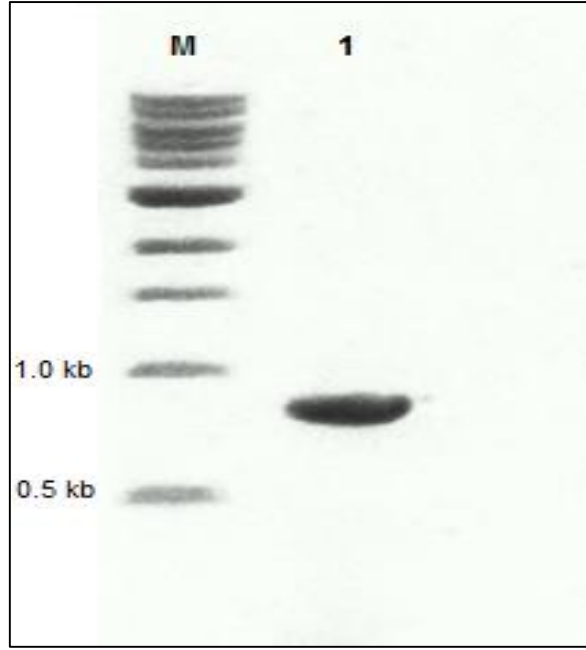
CDA2 geninin çoğaltılması ve plasmidlere (pET28a ve pTrc99A) klonlanması için restriksiyon enzim konumları seçilmiş ve Çizelge 3.3'te verilen primerler tasarlanmıştır. İleri primerin başına Xba1 (5'TCTAGA3'), geri primerlerin ucuna Sall (5'GTCGAC3') ve HindIII-HF (5'AAGCTT3') restriksiyon enzim konumları eklenmiştir. Tasarlanan ileri ve geri primerlerin erime sıcaklığı ( $T_m$ ) değerlerinin birbirine yakın olması gerekmektedir. Buna göre, tasarlanan primerlerin termodinamik özellikleri ve uzunlukları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Tasarlanan primerlerin özellikleri

İsim	$T_m$ (°C)	Uzunluğu (bc)
Xba1-cda2-f	55	35
Sall-cda2-r	54	42
HindIII-cda2-r	48	57

CDA2 geni, tasarlanan primerler yardımıyla, daha önceden bileşenleri ve Çizelge 3.4'te parametreleri belirtilen PCR tepkimesiyle, Taq DNA polimeraz ile çoğaltılmıştır. Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonunun kontrolü için, agaroz jel elektroforezi görüntüsü alınmıştır. Şekil 4.13, tasarlanan primerlerle çoğaltılan *cda2* geninin beklenen büyüklükte elde edildiğini göstermektedir.

PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra kitin deasetilaz DNA'sı, PCR karışım çözeltisinden QIAgen PCR saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

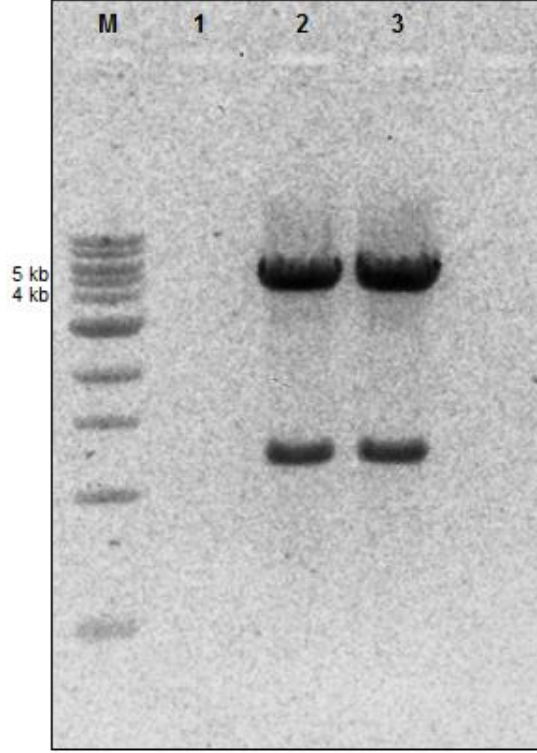


**Şekil 4.13.** CDA2 geninin agaroz jel elektroforezde görünümü. M: 1 kb DNA moleküler ağırlık standardı; 1: Polimeraz enzimi ile çoğaltılmış CDA2 geni (807 bç)

#### 4.3.2. Vektörün Elde Edilmesi ve Ligasyon Tepkimesi

PCR ile çoğaltılmış ve saflaştırılmış 0.807 kb büyüklüğündeki *cda2* geni ve plazmid saflaştırma kiti (QIAGEN) ile izole edilmiş pTRc99A vektörü ayrı ayrı 37 °C de, özel tamponlar içeren 20 µl'lik reaksiyon hacminde *Xba1* ve *HindIII*-HF enzimleri ile 15 dakika kesilmiştir. Vektörün kesme reaksiyonuna, ligasyon sırasında kesilen genin iki ucunun birbirine yapışmaması için 5'-fosfat gruplarının koparılmasını sağlayan alkalin fosfotaz enzimi (CIAP) eklenmiştir. Şekil 4.14'te pTRc99A vektörünün restriksiyon enzimlerle kesildikten sonraki genin, beklenen boyutta (4263 bç) olduğunu gösteren jel elektroforezdeki görüntüsü verilmiştir.





**Şekil 4.14.** pTrc99A vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonraki agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kb DNA moleküler ağırlık standardı; 1: Negatif kontrol (DNA yok); 2,3: XbaI ve HindIII-HF ile kesilmiş pTrc99A vektörü (4263 bç)

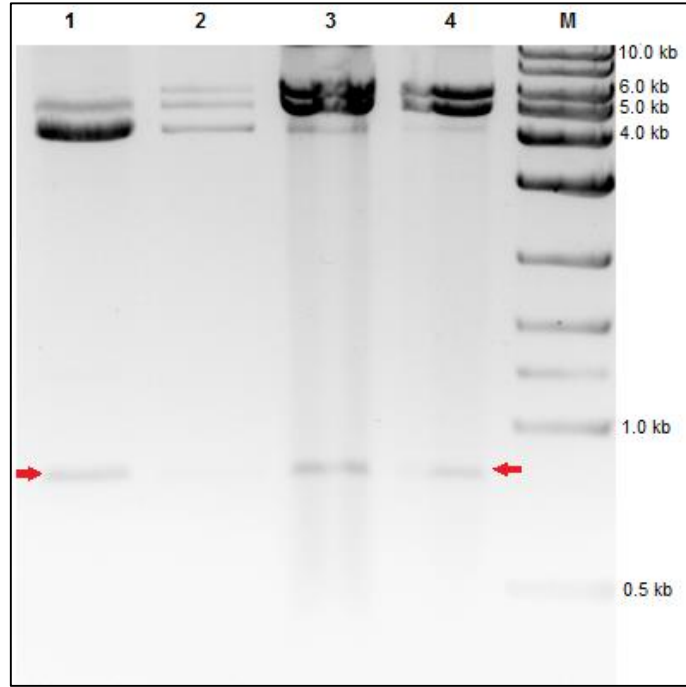
Jel elektroforezinden sonra klonlamada kullanılacak olan bant (4263 bç) jelden kesilerek, QIAquick Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen) ile saflaştırılmıştır. Vektör ve genin derişimleri Nanodrop ile belirlenmiştir. Restriksiyon enzim konumlarından sırasıyla kesilerek, yapışkan uçlu hale getirilen *cda2* geni, aynı restriksiyon enzimleri ile kesilen pTrc99A plazmidine, vektör:gen oranı 1:3 olacak şekilde 16°C'de 16st yürütülen ligasyon tepkimesiyle, T4 DNA ligaz enzimi katalizörlüğünde klonlanmıştır. Reaksiyon sonunda, tepkime ortamı 65°C de yaklaşık 10 dakika bekletilerek enzimler deaktive edilmiştir.

Rekombinant pET28a-ssDsbA-*cda2* plazmidini oluştururken de, vektörün restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu beklenen gen büyüklüğü (5431 bç) elde edilmiş ve benzer işlemler yapıldıktan sonra ligasyon tepkimesi gerçekleştirilmiştir.

#### **4.3.3. Klonların Restriksiyon Enzimleri ve DNA Dizi Analizi ile Kontrolü**

Ligasyon ürünü, tuzdan arındırıldıktan sonra plazmid taşımayan *E. coli* DH5α mikroorganizmasına CaCl<sub>2</sub> yöntemi ile aktarılmıştır. *E. coli* hücreleri, pTrc99A plazmidini için ampisilin, pET28a için kanamisin içeren LB agar ortamlara yayılmış ve 37°C'de 16 st süreyle çoğaltılmışlardır. Ertesi gün beliren kolonilerden, kültürler

inoküle edilmesinden sonra rekombinant plazmidler saflaştırılmış ve klonlamanın gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Kesilen plazmidlerin agaroz jel elektroforezde görüntüsü alınmış ve hem beklenen büyüklüklerde DNA molekülü gözlenmesi (Şekil 4.15) ile hem de DNA dizi analiziyle klonlamanın başarılı olduğu kanıtlanmıştır.



**Şekil 4.15.** Restriksiyon enzimleri ile kesilen rekombinant plazmidlerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 1: pTrc99A-ssDsbA-cda2 (4263 bç - 807 bç), 3,4: pET28a-ssDsbA-cda2 (5431 bç - 807 bç), M: 1 kb DNA moleküler ağırlık standardı.)

#### 4.4. Ekspresyon Çalışmaları

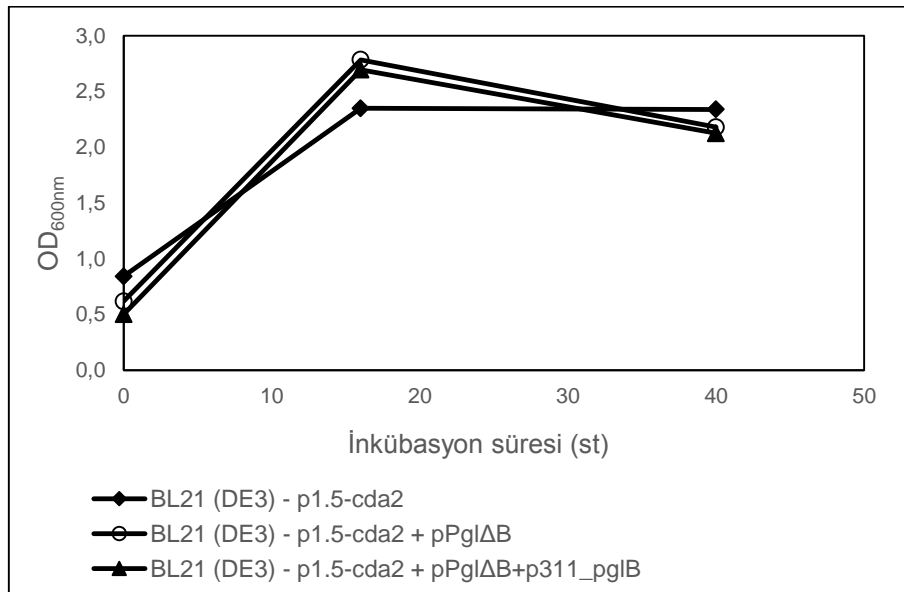
Çalışmanın bu kısmında, elde edilen rekombinant plazmidler *E. coli* CLM24 ve *E. coli* BL21(DE3) konak hücrelerine CaCl<sub>2</sub> metodu ile aktarılmıştır. Tasarlanan rekombinant sistemler Çizelge 4.4'te verilmiş olup; burada 1 ve 4 numaralı sistemler sadece *cda2* genini taşıyan plazmid; 2 ve 5 numaralı sistemler hem *cda2* genini taşıyan hem de glikanları içeren ancak glikozilasyonu (glikanların enzime eklenmesi) sağlayan PglB genini taşımayan, pPglΔB plazmidini; 3 ve 6 numaralı sistemler ise bu plazmidlere ek olarak glikozilasyonu sağlayan p311\_pglB ve pMAF\_pglB plazmidlerini içermektedir.

**Çizelge 4.4.** Rekombinant *E. coli* hücrelerinin içerdiği plazmidler

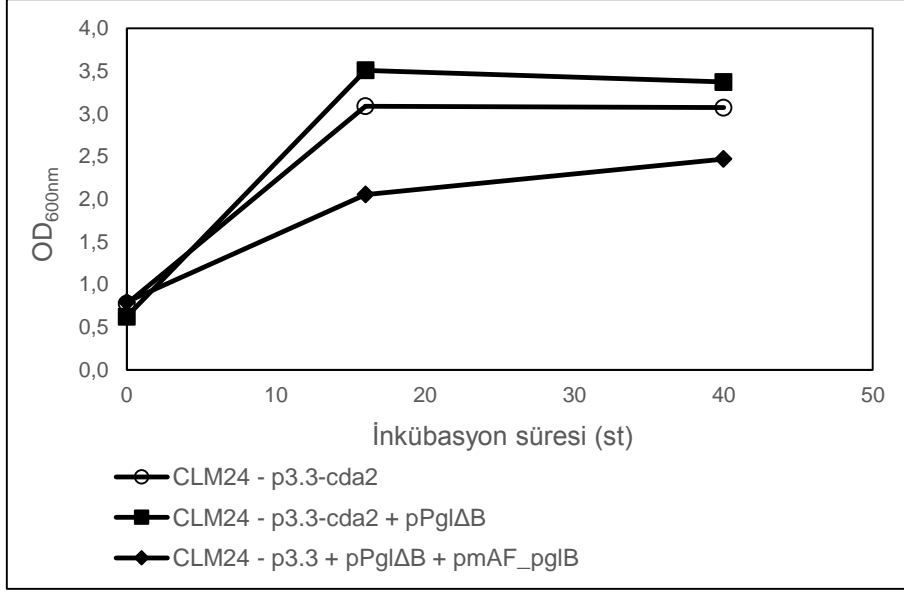
Sistem No	Konak Hücre	Plazmid I	Plazmid II	Plazmid III
1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	p1.5 pET28a-ssDsbA-cda2	-	-
2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	p1.5 pET28a-ssDsbA-cda2	pPglΔB	-
3	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	p1.5 pET28a-ssDsbA-cda2	pPglΔB	p311_pglB
4	<i>E. coli</i> CLM24	p3.3 pTrc99A- ssDsbA-cda2	-	-
5	<i>E. coli</i> CLM24	p3.3 pTrc99A- ssDsbA-cda2	pPglΔB	-
6	<i>E. coli</i> CLM24	p3.3 pTrc99A- ssDsbA-cda2	pPglΔB	pMAF_pglB

Transformasyonun ardından hücreler, içerisinde plazmidlerine göre seçici antibiyotikleri (Kan, Amp, Cm veya Tp) ve glukoz içeren 25 ml LB sıvı besi ortamında, 37°C'de ve 200 rpm çalkalama hızında çoğaltılmıştır. Bakteri kültürleri, hücre yoğunluğu (OD<sub>600</sub>) 0.5-0.6'ya ulaştığında son derişimi 0.1 mM olacak şekilde IPTG ve L-Arabinoz (1. ve 4. Sistemler hariç) ile indüklenmiş ve bu aşamadan sonra üretim sıcaklığı 30°C'ye düşürülmüştür.

Şekil 4.16 ve 4.17'de *E. Coli* BL21 (DE3) ve *E.coli* CLM24 hücrelerinin t=0 (IPTG ile indüklenmeden önce); t=16 ve t=40 saatlerinde ölçülen hücre derişimleri verilmiştir.



**Şekil 4.16.** Farklı ekspresyon vektörleri taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) suşlarının, hücre derişimlerinin zamanla değişimi (p1.5: pET28a-ssDsbA)

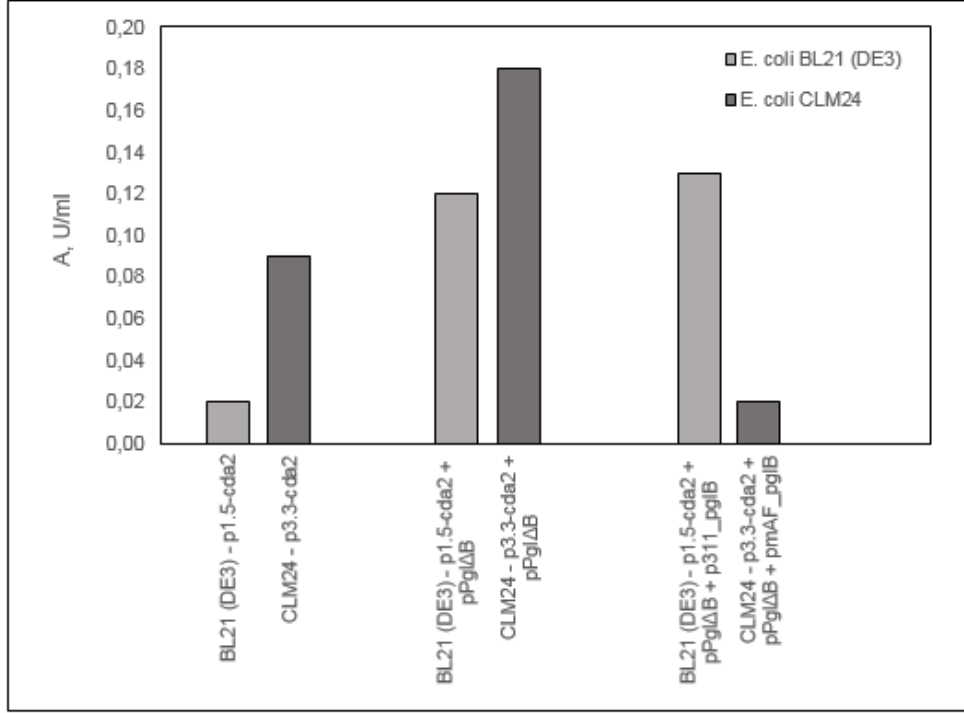


**Şekil 4.17.** Farklı ekspresyon vektörleri taşıyan *E. coli* CLM24 suşlarının, hücre derişimlerinin zamanla değişimi (p3.3: pTrc99A- ssDsbA)

Hücrelere indükleme yapıldıktan 16 saat sonra, maksimum hücre yoğunluğuna ulaşılmıştır. Martinou ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da *cda2* geni aktarılan *E. coli* hücrelerinde, IPTG indüklemesinden 16-17 saat sonra maksimum hücre yoğunluğu görüldüğü rapor edilmektedir [14]. pMAF\_pglB plazmidini içeren, yani glikoprotein üretebilen *E. coli* CLM24 hücrelerinde, glikozilasyonun gerçekleşmediği kontrol gruplarına göre daha az hücre çoğalması elde edilmiştir (Şekil 4.17). *E. coli* BL21 (DE3) suşunda ise glikozilasyona bağlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.16).

#### 4.4.1. CDA Aktivitesi

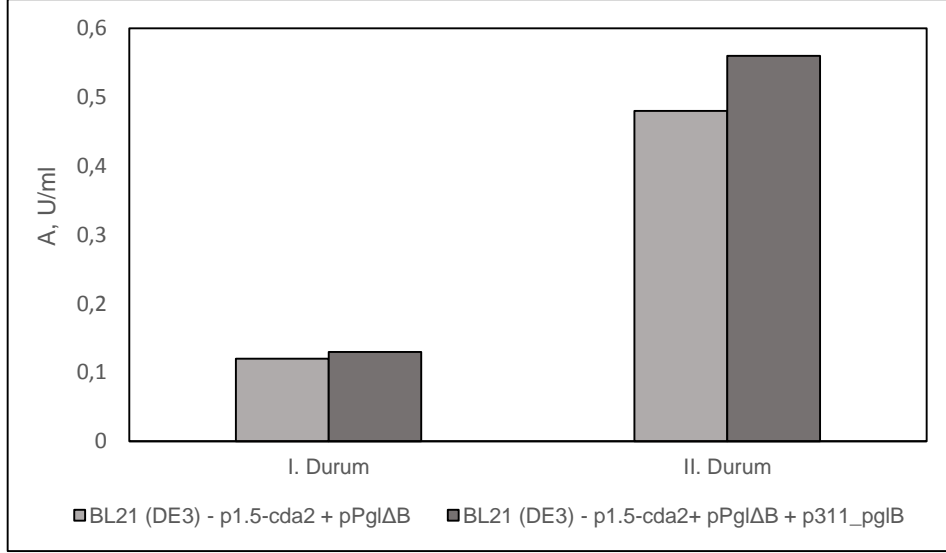
Enzim aktivitesi çalışmaları için IPTG indüklemesinden sonra, 16. saatteki hücreler kullanılmıştır. 25 ml hücre ortamından elde edilen pelletler 1 ml, 1x PBS ile süspansiyon haline getirilmiş ve hücreler sonikasyonla parçalandıktan sonra santrifüj sonucu kalan üst sıvı, enzim aktivitesi için kullanılmıştır. Şekil 4.18'de yukarıda bahsedilen, farklı plazmidler taşıyan *E. coli*'lerden elde edilen kitin deasetilaz enzimlerinin aktiviteleri verilmiştir.



**Şekil 4.18.** Farklı plazmidler taşıyan *E. coli* 'lerin 25 ml besi yerinde yapılan üretim ile elde edilen CDA aktiviteleri

Beklenildiği gibi, *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinden elde edilen enzim aktivitelerinin sırasıyla doğal enzimin olduğu sistemden, glikanların olduğu ama enzime takılmadığı ve glikozilasyonun gerçekleştiği sistemlere doğru artış gösterdiği görülmektedir. Ancak *E. coli* CLM24 sistemlerinden elde edilen enzimlerde, glikozilasyonun enzim aktivitesini negatif etkilediği gözlenmektedir (Şekil 4.18). Bu nedenle üretim deneylerine pET28a-ssDsbA-cda2 plazmidini taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri ile devam edilmiştir.

Enzim aktiviteleri istenilen şekilde, glikozillenme sonucu artış göstermiştir ancak aktivitelerin beklenilenden düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun, 25 ml ortamdaki hücrenin yoğun olduğu için, sonikasyonla yeteri kadar parçalanamadığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle, sonikasyon işleminde hücre derişimi azaltılmış, 1.5 ml ortamdaki hücrenin 300 µl 1x PBS ile süspansiyonuyla elde edilen enzimin aktivitesinin, 25 ml ortamdaki hücreden elde edilen enzim aktivitesinden yaklaşık 4 kat daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.19). Bundan sonraki çalışmalarda, sonikasyon işleminde düşük hücre derişimi kullanılmasına karar verilmiş, ancak en-iyileme çalışması ile aktivitenin arttırılabileceği düşünülmektedir.



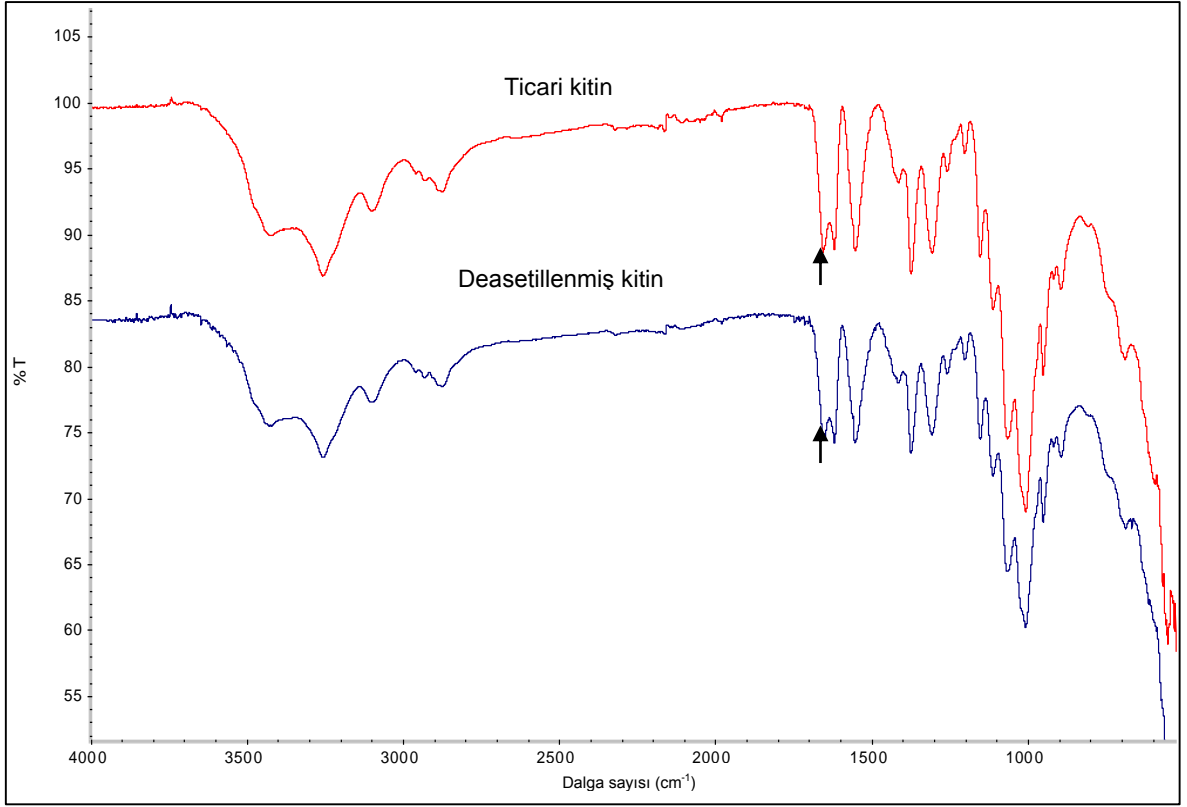
**Şekil 4.19.** Farklı seyreltme oranlarına sahip *E. coli* 'lerin CDA aktivitelerinin kıyaslanması (1: 25 ml hücre ortamından alınan peletin, 1 ml, 1x PBS ile süspansiyonuyla elde edilen enzim; 2: 1.5 ml hücre ortamından alınan peletin, 300 µl, 1x PBS ile süspansiyonuyla elde edilen enzim)

Kitin deasetilaz enziminin, bakterilerde glikoprotein yapısında üretimi ilk kez bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiştir. Literatürde *cda2* geninin *E. coli*'de ekspresyonu ile ilgili bir tane çalışma [14] bulunmaktadır. Ancak bu çalışmada hem elde edilen enzimin glikoprotein yapısında olmamasından hem de aktivite metodunun farklı olmasından dolayı tam bir karşılaştırma yapılamamıştır.

#### 4.4.2. Enzimatik Deasetilasyon Çalışmaları

Enzimatik deasetilasyon işlemi için glikoprotein yapıda elde edilen kitin deasetilaz enzimi (BL21 (DE3)- p1.5-cda2-pPglΔB + p311-pglB) kristal yapıdaki ticari kitin ile inkübasyona bırakılmış ve FT-IR ile spektrumları çıkarılmıştır (Şekil 4.20).

Enzimatik deasetilasyon sonucu, asetil gruplarını gösteren  $1655\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısındaki pik yüksekliğinde azalma beklenmektedir. Bunu belirlemek için referans pik olarak  $3430\text{ cm}^{-1}$ 'deki -OH pikleri seçilmiş ve deasetilasyon oranı %4.1 olarak hesaplanmıştır. Ticari kitinle inkübasyon sonucu elde edilen düşük deasetilasyon oranı, kitinin yüksek kristalinite yapısından dolayı enzimin asetil gruplarıyla zor etkileşime geçmesinden kaynaklanmaktadır ve tez çalışmasında, literatürdeki diğer araştırmacıların çalışmalarına [104, 109] göre daha yüksek deasetilasyon oranı elde edilmiştir. Deasetilasyon oranını daha da arttırmak için glikol kitosan, mikrobiyal kitin, %50'lik kitosan v.b. substratların denenmesi öngörülmektedir.



**Şekil 4.20.** Enzimatik deasetilasyona ait FT-IR spektrumu

## 5. SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında, klasik kitin kaynağına ve üretim metoduna alternatif olarak farklı yöntemlerle kitin ve kitosan üretimi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda çalışma üç ana kısımda yürütülerek, kabuklu canlılardan ve *Aspergillus niger* fungusunun hücre duvarından kitosan eldesi ve kitinin enzimatik deasetilasyonu için kitin deasetilaz enziminin rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir. deasetilasyonu için kitin deasetilaz enziminin rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın enzimatik kısmında, kitin deasetilaz geninin *E. coli*'ye klonlanmasıyla elde edilen rekombinant enzimin, doğal yapısına benzer bir yapıda üretimi ilk kez bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasından, daha spesifik olarak çıkarabilecek sonuçlar aşağıda verilmiştir:

1- Kerevit kabuklarından kitin ekstraksiyonu için yapılan işlemler sonucunda, uzaklaştırılan protein ve mineral içerikleri sırasıyla birinci kabuk için %26 ve %52; ikinci kabuk için %35 ve %44 olarak bulunmuştur. Aynı örneklerin kitin içerikleri ise sırasıyla %22 ve %21 olarak belirlenmiş olup literatür ile uyumludur.

2- Karides kabuklarından kitin ekstraksiyonu için yapılan çalışmalarda, önce deproteinizasyon sonra demineralizasyon işlemleri uygulandığında, uzaklaştırılan protein ve mineral içerikleri sırasıyla %18.7 ve %59.2; kazanılan kitin ise %22 olarak bulunmuştur. Önce demineralizasyon sonra deproteinizasyon işlemleri uygulandığında elde edilen protein, mineral ve kitin içerikleri ise sırasıyla %16.5, %64 ve %19.4 olarak belirlenmiştir. Tüm değerler literatür ile uyum içerisindedir.

3- Kabuklardan ekstrakte edilen kitine, otoklavda 121°C'de, 20 dakikada gerçekleştirilen deasetilasyon işlemi sonucunda kerevit ve karides kabuğundan sırasıyla %12.2 ve %18 kitosan üretim verimi elde edilmiştir. Etüvde 120°C'de 4 saat yapılan deasetilasyon işlemi sonucunda ise kitosan üretim yüzdeleri kerevit ve karides için sırasıyla %7 ve %6.8 olarak bulunmuştur. Bu durum otoklav kullanımının deasetilasyon verimini arttırdığını göstermektedir.

4- Elde edilen kitinlerin FT-IR analizlerinde, kitindeki asetamido gruplarını karakterize eden pikler 1655, 1553 ve 1310  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayılarında gözlemlenmiştir. Kitinlerin FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında, absorpsiyon bantlarının birbirleri ve ticari kitin ile birebir örtüştükleri görülmüştür. Ayrıca 1655  $\text{cm}^{-1}$  ve 1620  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayılarındaki pikler, elde edilen kitinlerin alfa yapısında olduğunu kanıtlamıştır.



**5-** Deasetilasyon sonucu elde edilen kitosanların FT-IR spektrumlarında, 3436 ve 3260  $\text{cm}^{-1}$ 'deki iki ayrı pikin, geniş bir pike dönüştüğü ve 1655  $\text{cm}^{-1}$ 'deki bant şiddetinin azaldığı gözlemlenmiştir. Kitosanların FT-IR pikleri birbirleri ve ticari kitosan ile uyumlu çıkmıştır ancak kitinde 3100  $\text{cm}^{-1}$ 'de bulunan pik, ticari kitosanda kaybolurken, bu çalışmada üretilen kitosanalarda ve literatürdeki çalışmalarda görülmektedir.

**6-** FT-IR spektrumlarındaki farklı pikler kullanılarak deasetilasyon dereceleri hesaplanmış ve iki farklı yöntem birbiriyle karşılaştırılmıştır. Buna göre;

FT-IR spektrumlarındaki 1655  $\text{cm}^{-1}$  ve 3450  $\text{cm}^{-1}$ 'deki piklerden yararlanılarak, otoklavdaki deasetilasyon işlemi sonucunda kerevit ve karides kitinlerinden elde edilen kitosanların deasetilasyon dereceleri sırasıyla %77 ve %62.4 olarak bulunmuştur. Etüvdeki deasetilasyon işlemi sonrasında ise aynı yöntem kullanılarak, kerevit ve karides kitinlerinden sırasıyla %73.1 ve %71.9 olarak hesaplanmıştır.

FT-IR spektrumlarındaki 1655  $\text{cm}^{-1}$  ve 2878  $\text{cm}^{-1}$ 'deki piklerden yararlanılarak, otoklavdaki deasetilasyon işlemi sonucunda kerevit ve karides kitinlerinden elde edilen kitosanların deasetilasyon dereceleri sırasıyla %74.8 ve %63.6 olarak bulunmuştur. Etüvdeki deasetilasyon işlemi sonrasında ise aynı yöntem kullanılarak, kerevit ve karides kitinlerinden sırasıyla %69.4 ve %70.4 olarak hesaplanmıştır.

İki farklı yöntemle de birbirine yakın sonuçlar elde edildiği görülmüştür ve elde edilen deasetilasyon dereceleri uygulanan işlemlere göre kabul edilebilir değerlerdir. Elde edilen deasetilasyon derecelerinin artırılması mümkün olup, bunun için sıcaklık, süre, kullanılan NaOH derişimi ve katı:NaOH oranı, çalışılan ortam gibi deasetilasyon derecesini etkileyen parametreleri içeren bir optimizasyon çalışması yapılması gerekmektedir.

**7-** Yapılan termal gravimetrik analizler sonucunda, kitin örneklerinde 60–100°C'de suyun buharlaşmasından ve 350–400°C'de sakkarit yapısının bozunmasından kaynaklandığı düşünülen, iki ağırlık kaybı görülmüştür. Kitosanların TGA grafiklerine bakıldığında ise, kitindeki bozunma sıcaklıklarına ek olarak 250-270°C'de üçüncü bir ağırlık kaybı gözlemlenmiştir. Bu bozunmanın deasetillenmiş moleküllerden

kaynaklandığı düşünülmemekte olup, bu durum kitosanın termal stabilitesinin kitine göre düşük olduğunu göstermiştir.

**8-** Fungus kaynaklı kitin ve kitosan üretimi kısmında, çoğaltılan *Aspergillus niger* fungusundan 8 günün sonunda, 9.3 g/l değerinde maksimum kuru biyokütle ağırlığı elde edilmiştir. Yapılan ekstraksiyon işlemleri sonucunda, %45.74 alkali çözünmeyen kısım, %13.73 kitin ve çok az miktarda kitosan elde edilmiş ve sonuçların literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Mikrobiyal kaynağın üretimi için önemli olan fermantasyon koşulları (besi ortamı, üretim süresi, vb.) hücre duvarının içerdiği kitin ve kitosan miktarlarını etkilemektedir. Bu çalışma kapsamında fermantasyon koşulları ile ilgili bir optimizasyon çalışması yapılmamıştır ancak daha verimli sonuçlar alınması için ileriye dönük çalışmalarda bu koşulların da optimize edilmesi öngörülmektedir.

**9-** *A. niger* fungusundan kitosan ekstraksiyonu işlemindeki protein giderimi kısmı öncelikle, 1 M NaOH ile 121°C'de 20 dakikada otoklavda ve 90°C'de 2 saat su banyosunda denenmiştir ve FT-IR analiz sonuçlarına göre ileriki çalışmaların otoklavda gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. *A. niger* küf mantarının hücre duvarından elde edilen kitosanın deasetilasyon derecesi en yüksek %74 olarak bulunmuştur. Elde edilen kitinden yola çıkılarak kimyasal yolla üretilen kitosanın deasetilasyon derecesi ise %86 olarak bulunmuştur. Bu değer yüksek çıkmasına, hem protein giderme işlemi için hem de deasetilasyon işlemi için, iki defa yüksek sıcaklıkta NaOH ile muamele edilmesinin etkisi olduğu düşünülmüştür.

**10-** *A. niger* fungusundan elde edilen kitosanların TGA grafikleri incelendiğinde, hem hücre duvarındaki kitosanda hem de kitinden elde edilen kitosanda 250-300°C'de ağırlık kaybı gerçekleştiği görülmektedir. Ayrıca, fungusdan elde edilen kitosanın da termal stabilitesinin, kabuklulardaki gibi kitine göre düşük olduğu gözlemlenmiştir.

**11-** Çalışmanın enzimatik kısmında, kitin deasetilaz geni (*cda2*) PCR ile çoğaltılmış ve agaroz jel elektroforezi ile 807 bp büyüklüğündeki gen elde edilmiştir. Çoğaltılmış *cda2* gen kaseti ile izole edilmiş pTRc99A ve pET28a vektörleri, restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve agaroz jel elektroforezinde sırasıyla 4263 ve 5431 bp büyüklüğündeki bantlar tespit edilmiştir. Kesilerek, yapışkan uçlu hale getirilen *cda2* geni, plazmidlere ligasyon tepkimesiyle klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmidler, plazmid taşımayan *E. coli* DH5α aktarıldıktan sonra hücreler

çoğaltılmıştır. Çoğalan kolonilerden rekombinant plazmidlerin saflaştırılması ve restriksiyon analizi sonrası agaroz jel elektroforezde beklenen büyüklüklerde DNA molekülü gözlenmesi ile hem de DNA dizi analiziyle klonlamanın başarılı olduğu kanıtlanmıştır.

**12-** Rekombinant plazmidlerin aktarıldığı *E. coli* BL21 (DE3) ve *E. coli* CLM24 konak hücrelerinin çoğalmaları incelendiğinde, hücrelere indükleme yapıldıktan 16 saat sonra, maksimum hücre yoğunluğuna ulaşıldığı görülmüştür. Buna göre enzim aktivite deneyleri 16. saatte alınan hücreler ile yapılmıştır.

**13-** Enzim aktivitesi incelendiğinde, *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinden elde edilen enzim aktivitelerinin sırasıyla doğal enzimin olduğu sistemden, glikozilasyonun gerçekleştiği sistemlere doğru artış gösterdiği görülmüştür. Ancak *E. coli* CLM24 sistemlerinde aynı durumu gözlenememiştir. Ayrıca, *E. coli* CLM24 hücrelerinde glikozilasyonun hücre çoğalmasını yavaşlattığı gözlenmiştir. Bu nedenlerle, üretim deneylerine pET28a-ssDsbA-cda2 plazmidini taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri ile devam edilmiştir.

**14-** 25 ml hücre ortamından kalan peletin, 1 ml 1x PBS ile süspansiyon edilmesinden elde edilen enzim sıvısı kullanıldığı durumdaki enzim aktivitesi ile 1.5 ml ortamdan alınan hücrenin peletinin 300 µl 1x PBS ile süspansiyonuyla elde edilen enzimin aktivitesi karşılaştırıldığında, ikinci durumda enzimin 4 kat daha fazla aktivite (0.56 U/ml) verdiği görülmüştür. Sonikasyonda kullanılan hücre derişiminde en-iyileme çalışmalarına ileriki çalışmalarda devam edilecektir.

**15-** Elde edilen rekombinant kitin deasetilaz enzimi, ticari kitin ile muamele edildiğinde, literatürdeki diğer araştırmacıların çalışmalarına (%3.7) [104] göre daha yüksek deasetilasyon oranı (%4.1) elde edilmiştir. Bu oranın, enzim üretiminde yapılacak en-iyileme çalışmaları sonrasında daha da artırılabilirliği düşünülmektedir.

**16-** Tez çalışması kapsamında hem farklı kitin kaynaklarından hem de farklı deasetilasyon yöntemleri ile kitosan üretilebildiği kanıtlanmıştır. Bu çalışma ile ayrıca, son zamanlarda çevre ve ürün kalitesi açısından önem kazanan enzimatik deasetilasyonda kullanılan kitin deasetilaz enziminin, *E. coli*'de glikoprotein yapıda üretilmesi ilk defa gerçekleştirilmiş olup, bu çalışma bu konudaki araştırmalar için yol gösterici olacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] Bartnicki-Garcia, S., Cell wall chemistry morphogenesis and taxonomy of fungi, *Annual Review of Microbiology*, 22, 87-108, **1968**.
- [2] Aranaz, I., Mengibar M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A., Functional characterization of chitin and chitosan, *Current Chemical Biology*, 3, 203-230, **2009**.
- [3] Aiba, S., Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially n-acetylated chitosans, *International Journal of Biological Macromolecules*, 14, 225-228, **1992**.
- [4] Nwe, N., Chandkrachang, S., Stevens, W.F., Maw, T., Tan, T.K., Khor, E., Wong, S.M., Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation, *Carbohydrate Polymers*, 49, 235-237, **2002**.
- [5] Teng, W.L., Khor, E., Tan, T.K., Lim, L.Y., Tan, S.C., Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi, *Carbohydrate Research*, 332, 305-316, **2001**.
- [6] Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F.A., Conway, W.S., Sams, C.E., Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3888-3894, **2005**.
- [7] Chang, K.L.B., Tsai, G., Lee, J., Fu, W.-R., Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution, *Carbohydrate Research*, 303, 327-332, **1997**.
- [8] Pareek, N., Vivekanand, V., Agarwal, P., Saroj, S., Singh, R.P., Bioconversion to chitosan: A two stage process employing chitin deacetylase from *Penicillium oxalicum* SAE(M)-51, *Carbohydrate Polymers*, 96, 417-425, **2013**.
- [9] Kafetzopoulos, D., Martinou, A., Bouriotis, V., Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 2564-2568, **1993**.
- [10] Gao, X.D., Katsumoto, T., Onodera, K., Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*, *Journal of Biochemistry*, 117, 257-263, **1995**.
- [11] Alfonso, C., Nuero, O., Santamaría, F., Reyes, F., Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation, *Current Microbiology*, 30, 49-54, **1995**.
- [12] Christodoulidou, A., Briza, P., Ellinger, A., Bouriotis, V., Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes, *FEBS Letters*, 460, 275-279, **1999**.
- [13] Wang, Y., Song, J.-Z., Yang, Q., Liu, Z.-H., Huang, X.-M., Chen, Y., Cloning of a heat-stable chitin deacetylase gene from *Aspergillus nidulans* and its functional expression in *Escherichia coli*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 843-854, **2010**.
- [14] Martinou, A., Koutsioulis, D., Bouriotis, V., Cloning and expression of a chitin deacetylase gene (CDA2) from *Saccharomyces cerevisiae* in

- Escherichia coli*: Purification and characterization of the cobalt-dependent recombinant enzyme, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 757-763, **2003**.
- [15] Gauthier, C., Clerisse, F., Dommes, J., Jaspar-Versali, M.-F., Characterization and cloning of chitin deacetylases from *Rhizopus circinans*, *Protein Expression and Purification*, 59, 127-137, **2008**.
- [16] Shrestha, B., Blondeau, K., Stevens, W.F., Hegarat, F.L., Expression of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization, *Protein Expression and Purification*, 38, 196-204, **2004**.
- [17] Szymanski, C.M., Yao, R., Ewing, C.P., Trust, T.J., Guerry, P., Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*, *Molecular Microbiology*, 32, 1022-1030, **1999**.
- [18] Wacker, M., Linton, D., Hitchen, P.G., Nita-Lazar, M., Haslam, S.M., North, S.J., Panico, M., Morris, H.R., Dell, A., Wren, B.W., Aebi, M., N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E-coli*, *Science*, 298, 1790-1793, **2002**.
- [19] Muzarelli R.A.A., Peter M.G., *Chitin Handbook*, Atec, Grottammare, **1977**.
- [20] Terbojevich, M., Muzzarelli, R.A.A., Chitosan, *Handbook of hydrocolloids*, (eds: Phillips G.O., Williams P.A.), CRC Press, USA, **2000**.
- [21] Rinaudo, M., Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632, **2006**.
- [22] Winterowd J.G., Sandford P.A., Chitin and Chitosan, *Food Polysaccharides and Their Applications*, (eds: Stephen, A.M.) Marcel Dekker Inc., New York, 441, **1995**.
- [23] Kumar, M.N.V.R., A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27, **2000**.
- [24] Khan, T.A., Peh, K.K., Ch'ng, H.S., Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 205-212, **2002**.
- [25] Demir, A., Seventekin N., Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları, *Electronic Journal of Textile Technologies*, 3, 92-103, **2009**.
- [26] Kaur, S., Dhillon, G.S., The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications, *Critical Reviews in Microbiology*, 40, 155-175, **2014**.
- [27] Amorim, R.V.S., Melo, E.S., Carneiro-da-Cunha, M.G., Ledingham, W.M., Campos-Takaki, G.M., Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization, *Bioresource Technology*, 89, 35-39, **2003**.
- [28] Lee, D.-W., Powers, K., Baney, R., Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, 58, 371-377, **2004**.

- [29] Rutherford F.A., Austin P.R., Marine chitin properties and solvents in: *Proceedings of the 1st International Conference on Chitin/Chitosan*, (eds: Muzzarelli R.A.A., Pariser, E.R.), Cambridge, 182–192, **1978**.
- [30] Kurita, K., Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, *Progress in Polymer Science*, 26, 1921-1971, **2001**.
- [31] Kurita, K., Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans, *Marine Biotechnology*, 8, 203-226, **2006**.
- [32] Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M., Chiellini, E., Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, 36, 981-1014, **2011**.
- [33] Li, Q., Dunn, E.T., Grandmaison, E.W., Goosen, M.F.A., Applications and properties of chitosan, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 7, 370-397, **1992**.
- [34] Galed, G., Miralles, B., Paños, I., Santiago, A., Heras, Á., N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin, *Carbohydrate Polymers*, 62, 316-320, **2005**.
- [35] Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A., Vincendon, M., Vottero, P., On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin, *Polymer*, 41, 2463-2469, **2000**.
- [36] Cho, Y.W., Jang, J., Park, C.R., Ko, S.W., Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins, *Biomacromolecules*, 1, 609-614, **2000**.
- [37] Chatelet, C., Damour, O., Domard, A., Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials*, 22, 261-268, **2001**.
- [38] Kurita, K., Kaji, Y., Mori, T., Nishiyama Y., Enzymatic degradation of  $\beta$ -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation, *Carbohydrate Polymers*, 42, 19-21, **2000**.
- [39] Kofuji, K., Qian, C.-J., Nishimura, M., Sugiyama, I., Murata, Y., Kawashima, S., Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan, *European Polymer Journal*, 41, 2784-2791, **2005**.
- [40] Liu, X.F., Guan, Y.L., Yang, D.Z., Li, Z., De Yao, K., Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan, *Journal of Applied Polymer Science*, 79, 1324-1335, **2001**.
- [41] Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E., Zikakis, J.P., Chitin - new facets of research, *Science*, 212, 749-753, **1981**.
- [42] Peng, Y.F., Han, B.Q., Liu, W.S., Xu, X.J., Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan, *Carbohydrate Research*, 340, 1846-1851, **2005**.
- [43] Kumar, M., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A.J., Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, *Chemical Reviews*, 104, 6017-6084, **2004**.

- [44] Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S.V., Tamura, H., Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications, *Biotechnology Advances*, 28, 142-150, **2010**.
- [45] Spagna, G., Barbagallo, R.N., Casarini, D., Pifferi, P.G., A novel chitosan derivative to immobilize  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies, *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 427-438, **2001**.
- [46] Xi, F., Wu, J., Macroporous chitosan layer coated on non-porous silica gel as a support for metal chelate affinity chromatographic adsorbent, *Journal of Chromatography A*, 1057, 41-47, **2004**.
- [47] Rane, K.D., Hoover, D.G., An evaluation of alkali and acid treatments for chitosan extraction from fungi, *Process Biochemistry*, 28, 115-118, **1993**.
- [48] Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.-J., Food applications of chitin and chitosans, *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37-51, **1999**.
- [49] Anitha, A., Sowmya, S., Kumar, P.T.S., Deepthi, S., Chennazhi, K.P., Ehrlich, H., Tsurkan, M., Jayakumar, R., Chitin and chitosan in selected biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, 39, 1644-1667, **2014**.
- [50] Hirano, S., Chitin Biotechnology Applications, *Biotechnology Annual Review*, (eds: El-Gewely, M.R.), Elsevier, 237-258, **1996**.
- [51] Dodane, V., Vilivalam, V.D., Pharmaceutical applications of chitosan, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1, 246-253, **1998**.
- [52] Harish Prashanth, K.V., Tharanathan, R.N., Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview, *Trends in Food Science & Technology*, 18, 117-131, **2007**.
- [53] No, H.K., Cho, Y.I., Meyers, S.P., Dye binding capacity of commercial chitin products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1939-1942, **1996**.
- [54] Arthur Felse, P., Panda, T., Studies on applications of chitin and its derivatives, *Bioprocess Engineering*, 20, 505-512 **1999**.
- [55] Zhang, M., Haga, A., Sekiguchi, H., Hirano, S., Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx Mori*) pupa exuvia, *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 99-105, **2000**.
- [56] Mathur, N.K., Narang, C.K., Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals, *Journal of Chemical Education*, 67, 938-942, **1990**.
- [57] Islam, M.S., Khan, S., Tanaka, M., Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments, *Marine Pollution Bulletin*, 49, 103-110, **2004**.
- [58] Rødde, R.H., Einbu, A., Vårum, K.M., A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*), *Carbohydrate Polymers*, 71, 388-393, **2008**.
- [59] Johnson, E.L., Peniston, Q.P., Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production, *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products* (eds: Martin, G.J., Hebard, C.E.), Westport CT, 514-522, **1982**.

- [60] Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A., Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties, *Polymer*, 44, 7939-7952, **2003**.
- [61] Synowiecki, J., Al-Khateeb, N.A., Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 145-171, **2003**.
- [62] Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S., Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*, *Fems Microbiology Reviews*, 26, 239-256, **2002**.
- [63] Bartnicki-Garcia, S., Lippman, E., Fungal morphogenesis - cell wall construction in *Mucor rouxii*, *Science*, 165, 302-4, **1969**.
- [64] Synowiecki, J., AlKhateeb, N.A.A.Q., Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan, *Food Chemistry*, 60, 605-610, **1997**.
- [65] Hu, K.J., Yeung, K.W., Ho, K.P., Hu, J.L., Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *Absidia glauca*, *Journal of Food Biochemistry*, 23, 187-196, **1999**.
- [66] Pochanavanich, P., Suntornsuk, W., Fungal chitosan production and its characterization, *Letters in Applied Microbiology*, 35, 17-21, **2002**.
- [67] Suntornsuk, W., Pochanavanich, P., Suntornsuk, L., Fungal chitosan production on food processing by-products, *Process Biochemistry*, 37, 727-729, **2002**.
- [68] Nwe, N., Stevens, W., Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction, *Biotechnology Letters*, 24, 131-134, **2002**.
- [69] Crestini, C., Kovac, B., GiovannozziSermanni, G., Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*, *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 207-210, **1996**.
- [70] Brown, D.E., Thornton, A.J., Chitinous material in *Trichoderma reesei*, *Biotechnology Letters*, 20, 777-779, **1998**.
- [71] No, H.K., Hur, E.Y., Control of foam formation by antifoam during demineralization of crustacean shell in preparation of chitin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3844-3846, **1998**.
- [72] Percot, A., Viton, C., Domard, A., Characterization of shrimp shell deproteinization, *Biomacromolecules*, 4, 1380-1385, **2003**.
- [73] Kaur, S., Dhillon, G.S., Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: a review, *Critical Reviews in Biotechnology*, 0, 1-18, **2013**.
- [74] Fernandez-Martin, F., Arancibia, M., Lopez-Caballero, E., Gomez-Guillen, C., Montero, P., Fernandez-Garcia, M., Preparation and Molecular Characterization of Chitosans Obtained from Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Shells, *Journal of Food Science*, 79, 1722-1731, **2014**.
- [75] Hajji, S., Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M., Jellouli, K., Structural differences between chitin and chitosan extracted



- from three different marine sources, *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 298-306, **2014**.
- [76] No, H.K., Meyers, S.P., Lee, K.S., Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 575-579, **1989**.
- [77] Healy, M., Green, A., Healy, A., Bioprocessing of marine crustacean shell waste, *Acta Biotechnologica*, 23, 151-160, **2003**.
- [78] Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., Gonzalez, R.O., Hall, G.M., Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation, *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 446-452, **2001**.
- [79] Rao, M.S., Munoz, J.H., Stevens, W.F., Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 808-813, **2000**.
- [80] Jung, W.-J., Jo, G.-H., Kuk, J.-H., Kim, K.-Y., Park, R.-D., Demineralization of crab shells by chemical and biological treatments, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10, 67-72, **2005**.
- [81] Aytekin, O., Elibol, M., Cocultivation of *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirae* for biological chitin extraction from prawn waste, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33, 393-399, **2010**.
- [82] Jung, W.J., Jo, G.H., Kuk, J.H., Kim, K.Y., Park, R.D., Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 234-237, **2006**.
- [83] Prameela, K., Mohan, M.C., Hemalatha, K.P.J., Extraction of pharmaceutically important chitin and carotenoids from shrimp biowaste by microbial fermentation method, *Journal of Pharmacy Research*, 3, 2393-5, **2010**.
- [84] Rao, M.S., Stevens, W.F., Quality parameters of chitosan derived from fermentation of shrimp biomaterial using a drum reaction, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 1080-87, **2005**.
- [85] White, S.A., Farina, P.R., Fulton, I., Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*, *Applied and Environment Microbiology*, 38, 323-328, **1979**.
- [86] Cherif, M., Benhamou, N., Belanger R.R., Occurrence of cellulose and chitin in the hyphal walls of *Pythium ultimum* - a comparative study with other plant pathogenic fungi, *Canadian Journal of Microbiology*, 39, 213-22, **1993**.
- [87] Di Mario, F., Rapana, P., Tomati, U., Galli, E., Chitin and chitosan from Basidiomycetes, *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 8-12, **2008**.
- [88] Knorr, D., Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management, *Food Technology*, 45, 114-122, **1991**.

- [89] Maghsoodi, V., Yaghmaei, S., Beigi, S.M., Influence of different nitrogen sources on amount of chitosan production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation, *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering-International English Edition*, 27, 47-52, **2008**.
- [90] Dhillon, G.S., Kaur, S., Brar, S.K., Verma, M., Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia, *Critical Reviews in Biotechnology*, 33, 379-403, **2013**.
- [91] Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A.K., Chatterjee, B.P., Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization, *Process Biochemistry*, 40, 395-400, **2005**.
- [92] Tan, S.C., Tan, T.K., Wong, S.M., Khor, E., The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time, *Carbohydrate Polymers*, 30, 239-242, **1996**.
- [93] Jaworska, M.M., Konieczna, E., The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus *Absidia orchidis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 220-224, **2001**.
- [94] Arcidiacono, S., Kaplan, D.L., Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions, *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 281-286, **1992**.
- [95] Stevens W.F., Win, N.N., Ng C.H., Pichyangkura C., Chandrkrachang S., Towards technical biocatalytic deacetylation of chitin, *Advances in chitin science*, (eds: Domard A., Roberts, G.A.F.), Jacques Andre, 40-47, **1997**.
- [96] Wibowo, S., Velazquez, G., Savant, V., Torres, J.A., Effect of chitosan type on protein and water recovery efficiency from surimi wash water treated with chitosan–alginate complexes, *Bioresource Technology*, 98, 539-545, **2007**.
- [97] Sannan, T., Kurita, K., Iwakura, Y., Studies on chitin, *Macromolecular Chemistry*, 177, 3589–3600, **1976**.
- [98] No, H.K., Meyers, S.P., Preparation and characterization of chitin and chitosan- a review., *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4, 27-52, **1995**.
- [99] Bough, W., Salter, W., Wu, A., Perkins, B., Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. I. Chemical compositions, viscosity, and molecular-weight distribution of chitosan products, *Biotechnonology and Bioengineering*, 20, 1931–1943, **1978**.
- [100] No, H.K., Cho, Y.I., Kim, H.R., Meyers, S.P., Effective Deacetylation of Chitin under Conditions of 15 psi/121 °C, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2625-2627, **2000**.
- [101] Dung, P.I., Milas, M., Rinaudo, M., Desbrières, J., Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan, *Carbohydrate Polymers*, 24, 209-214, **1994**.

- [102] Martinou, A., Kafetzopoulos, D., Bouriotis, V., Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes, *Carbohydrate Research*, 273, 235-242, **1995**.
- [103] Win N.N., Stevens, W.F., Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 334-341, **2001**.
- [104] Cai, J., Yang, J., Du, Y., Fan, L., Qiu, Y., Li, J., Kennedy, J.F., Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*, *Carbohydrate Polymers*, 65, 211-217, **2006**.
- [105] Anonim, <http://www.cazy.org/> (Aralık, **2014**).
- [106] Coutinho, P.M., Henrissat, B., Carbohydrate-active enzymes: An integrated database approach. *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, (eds: Gilbert, H.J., Davies, G., Henrissat, B., Svensson, B.), The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 3-12, **1999**.
- [107] [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?reaction+R02333+R06241](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?reaction+R02333+R06241) (Aralık, **2014**).
- [108] Christodoulidou A, Bouriotis, V., Thireos, G., Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*, *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 31420-31425, **1996**.
- [109] Tsigos, I., Bouriotis, V., Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 26286-26291, **1995**.
- [110] Mendgen, K., Hahn, M., Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi, *Annual Review of Phytopathology*, 34, 367–386, **1996**.
- [111] Martinou, A., Mode of action of chitin deacetylase from *M. rouxii* on partially N-acetylated chitosans, *Carbohydrate Research*, 311, 71-78, **1998**.
- [112] Tsigos, I., Zydowicz, N., Martinou, A., Bouriotis, V., Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides, *European Journal of Biochemistry*, 261, 698-705, **1999**.
- [113] Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., Bouriotis, V., Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology, *Trends in biotechnology*, 18, 305-312, **2000**.
- [114] Araki, Y., Ito, E., A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: Enzymatic deacetylation of chitin, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 56, 669-675, **1974**.
- [115] Tokuyasu, K., OhnishiKameyama, M., Hayashi, K., Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60, 1598-1603, **1996**.
- [116] Young-Ju, K., Zhao, Y., Oh, K.T., Nguyen, V.N., Park, R.D., Enzymatic deacetylation of chitin by extracellular chitin deacetylase from a newly screened *Mortierella* sp DY-52, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 759-766, **2008**.

- [117] Pareek, N., Vivekanand, V., Saroj, S., Sharma, A.K., Singh, R.P., Purification and characterization of chitin deacetylase from *Penicillium oxalicum* SAEM-51, *Carbohydrate Polymers*, 87, 1091-1097, **2012**.
- [118] Martinou, A., Koutsioulis, D., Bouriotis, V., Expression, Purification, and Characterization of a Cobalt-Activated Chitin Deacetylase (Cda2p) from *Saccharomyces cerevisiae*, *Protein Expression and Purification*, 24, 111-116, **2002**.
- [119] Kang, L., Synthesis and High Expression of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris* GS115, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1202-1207, **2012**.
- [120] Tokuyasu, K., Ohnishi-Kameyama, M., Hayashi, K., Mori, Y., Cloning and expression of chitin deacetylase gene from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 418-423, **1999**.
- [121] Yamada, M., Kurano, M., Inatomi, S., Taguchi, G., Okazaki, M., Shimosaka, M., Isolation and characterization of a gene coding for chitin deacetylase specifically expressed during fruiting body development in the basidiomycete *Flammulina velutipes* and its expression in the yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiology Letters*, 289, 130-137, **2008**.
- [122] Apweiler, R., Hermjakob, H., Sharon, N., On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1473, 4-8, **1999**.
- [123] Spiro, R.G., Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds, *Glycobiology*, 12, 43R-56R, **2002**.
- [124] Swanwick, R.S., Daines, A.M., Tey, L.H., Flitsch, S.L., Allemann, R.K., Increased thermal stability of site-selectively glycosylated dihydrofolate reductase, *Chembiochem*, 6, 1338-1340, **2005**.
- [125] Baek, W.O., Vijayalakshmi, M.A., Effect of chemical glycosylation of RNase A on the protein stability and surface histidines accessibility in immobilized metal ion affinity electrophoresis (IMAGE) system, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1336, 394-402, **1997**.
- [126] Masarova, J., Mislovicova, D., Gemeiner, P., Michalkova, E., Stability enhancement of *Escherichia coli* penicillin G acylase by glycosylation with yeast mannan, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 34, 127-133, **2001**.
- [127] Broersen, K., Voragen, A.G.J., Hamer, R.J., de Jongh, H.H.J., Glycoforms of beta-lactoglobulin with improved thermostability and preserved structural packing, *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 78-87, **2004**.
- [128] Wang, C.Q., Eufemi, M., Turano, C., Giartosio, A., Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins, *Biochemistry*, 35, 7299-7307, **1996**.
- [129] Gimenez-Roqueplo, A.P., Celerier, J., Lucarelli, G., Corvol, P., Jeunemaitre, X., Role of N-glycosylation in human angiotensinogen, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 21232-21238, **1998**.

- [130] Kwon, K.S., Yu, M.H., Effect of glycosylation on the stability of alpha(1)-antitrypsin toward urea denaturation and thermal deactivation, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1335, 265-272, **1997**.
- [131] Helenius, A., Aebi, M., Intracellular functions of N-linked glycans, *Science*, 291, 2364-2369, **2001**.
- [132] Baker, J.L., Celik, E., DeLisa, M.P., Expanding the glycoengineering toolbox: the rise of bacterial N-linked protein glycosylation, *Trends in Biotechnology*, 31, 49-59, **2013**.
- [133] Kauss, H., Bauch, B., Chitin Deacetylase from *Colletotrichum-Lindemuthianum*, *Methods in Enzymology*, 161, 518-524, **1988**.
- [134] Win N.N., Pengju, G., Stevens W.F., Deacetylation of chitin by fungal enzymes. *Advances in chitin science*, (eds: Peter M.G., Muzzarelli R.A.A.), University of Potsdam, 55-62, **2000**.
- [135] Bergmeyer, H.U., *Methods of Enzymatic Analysis*, 2. Baskı, 1974: Verlag Chemie, Weinheim, 112-117, **1974**.
- [136] Fisher, A.C., Haitjema, C.H., Guarino, C., Celik, E., Endicott, C.E., Reading, C.A., Merritt, J.H., Ptak, A.C., Zhang, S., DeLisa, M.P., Production of Secretory and Extracellular N-Linked Glycoproteins in *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 871-881, **2011**.
- [137] Feldman, M.F., Wacker, M., Hernandez, M., Hitchen, P.G., Marolda, C.L., Kowarik, M., Morris, H.R., Dell, A., Valvano, M.A., Aebi, M., Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 3016-3021, **2005**.
- [138] Sambrook, J., Russell, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, **2001**.
- [139] Anonim <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/> (Aralık, **2014**).
- [140] Anonim, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Aralık, **2014**).
- [141] Van de Velde, K., Kiekens, P., Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state <sup>13</sup>C NMR, *Carbohydrate Polymers*, 58, 409-416, **2004**.
- [142] Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S.-I., Shimoda, K., Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation behavior and characteristic properties, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31, 485-491, **1993**.
- [143] Paulino, A.T., Simionato, J.I., Garcia, J.C., Nozaki, J., Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides, *Carbohydrate Polymers*, 64, 98-103, **2006**.
- [144] Cai, J., Yang, J., Du, Y., Fan, L., Qiu, Y., Li, J., Kennedy, J.F., Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant, *Carbohydrate Polymers*, 64, 151-157, **2006**.

## EKLER

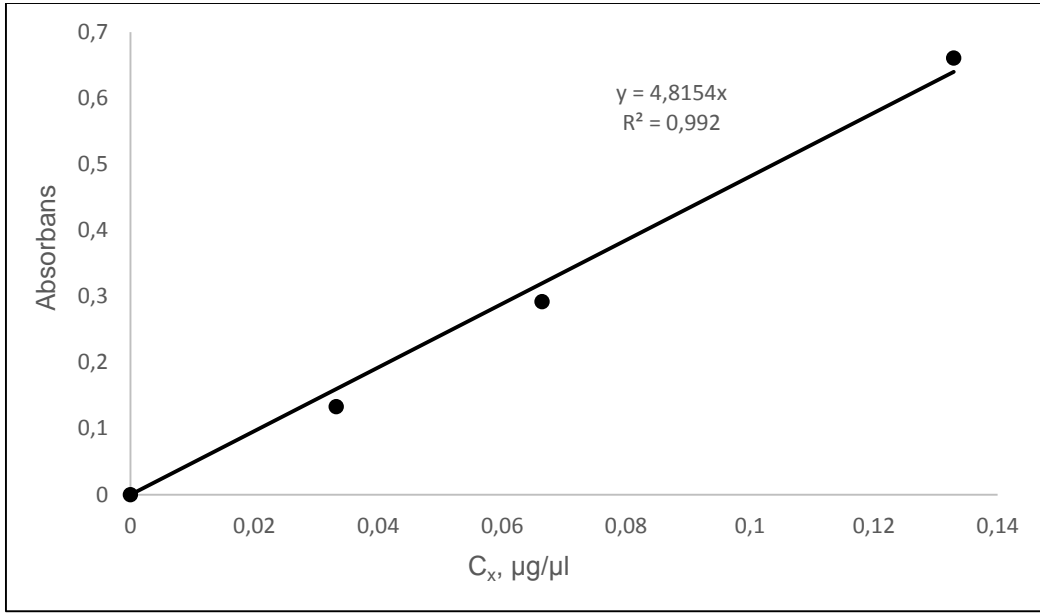
**Ek 1.** Kabuklular ve *A. niger*'den, kitin ve kitosan ekstraksiyonunda kullanılan çözeltiler

% 3.5 (w/v) NaOH çözeltisi	3.5 g NaOH dH <sub>2</sub> O ile 100 ml'ye tamamlanır.
1 M HCl çözeltisi	8.33 ml, %37'lik derişik HCl dH <sub>2</sub> O ile 100 ml'ye tamamlanır.
1 M NaOH çözeltisi	4 g NaOH dH <sub>2</sub> O ile 100 ml'ye tamamlanır.
%2 (v/v) CH <sub>3</sub> COOH çözeltisi	2.5 ml, %80'lik CH <sub>3</sub> COOH dH <sub>2</sub> O ile 100 ml'ye tamamlanır.

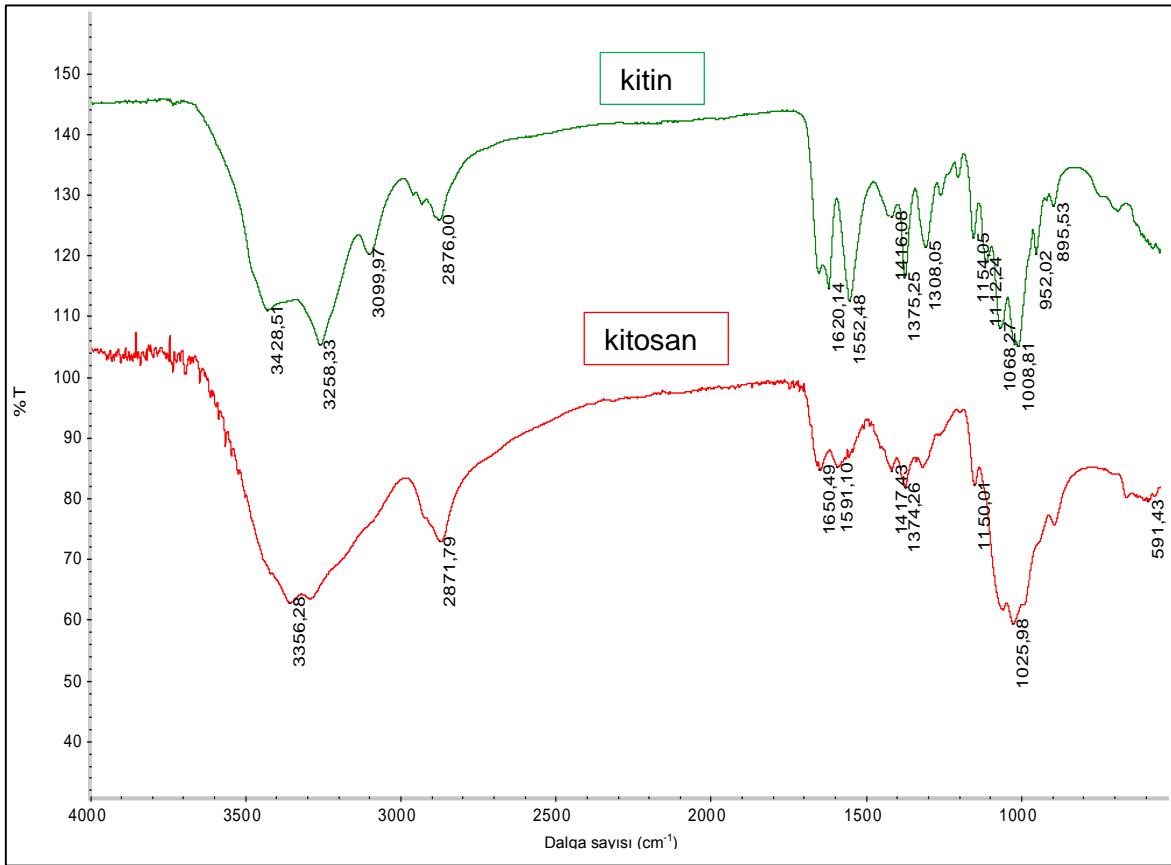
**Ek 2.** Genetik mühendisliği tekniklerinde kullanılan tamponlar ve çözeltiler

10x TBE	108 g Tris bazı, 55 g borik asit, 40 ml, 0.5 M EDTA (pH 8.0) dH <sub>2</sub> O ile 1000 ml'ye tamamlanır.
10x TE	10 ml, 1 M Tris-Cl 0.4 ml, 0.5 M EDTA (pH 8.0) dH <sub>2</sub> O ile 100 ml'ye tamamlanır.
10x PBS	32 g NaCl, 0.8 g KCl, 5.76 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.96 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> dH <sub>2</sub> O ile 400 ml'ye tamamlanır.
SOB	20 g bakto tripton, 5 g maya özütü 0.58 g NaCl, 0.19 g KCl dH <sub>2</sub> O ile 1000 ml'ye tamamlanır. 10 ml, 100x Mg <sup>+2</sup> eklenir.
100x Mg <sup>+2</sup>	20.34 g MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 24.64 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O dH <sub>2</sub> O ile 100 ml'ye tamamlanır.

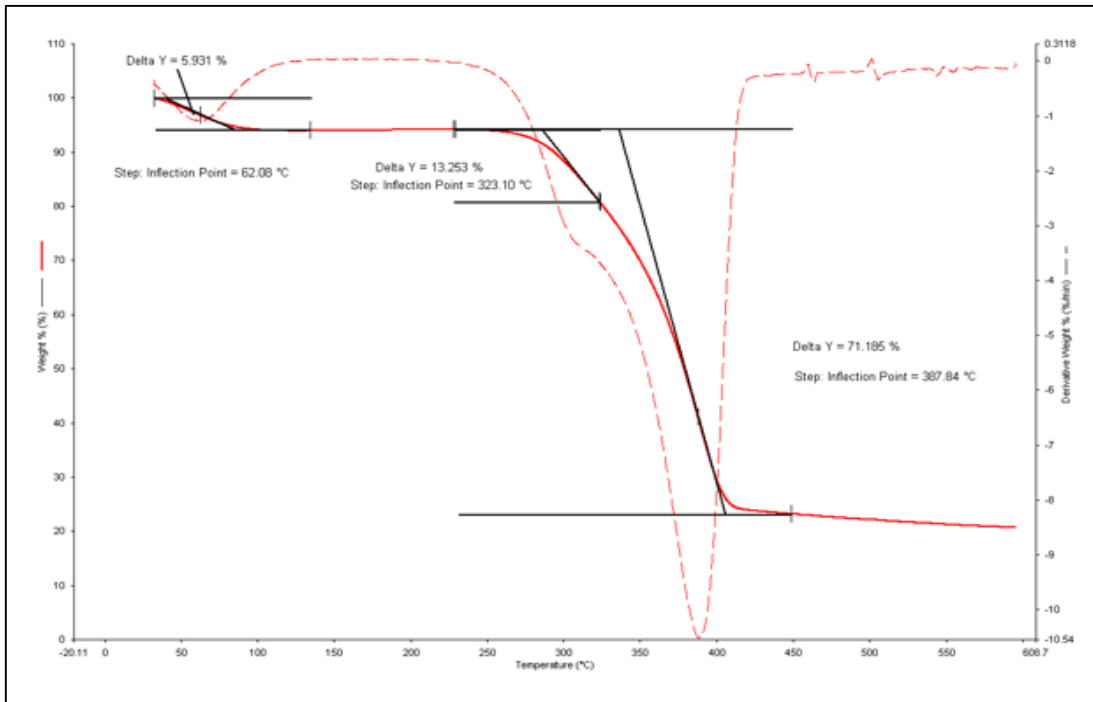
### Ek 3. Kitin deasetilaz aktivitesi kalibrasyon grafiği



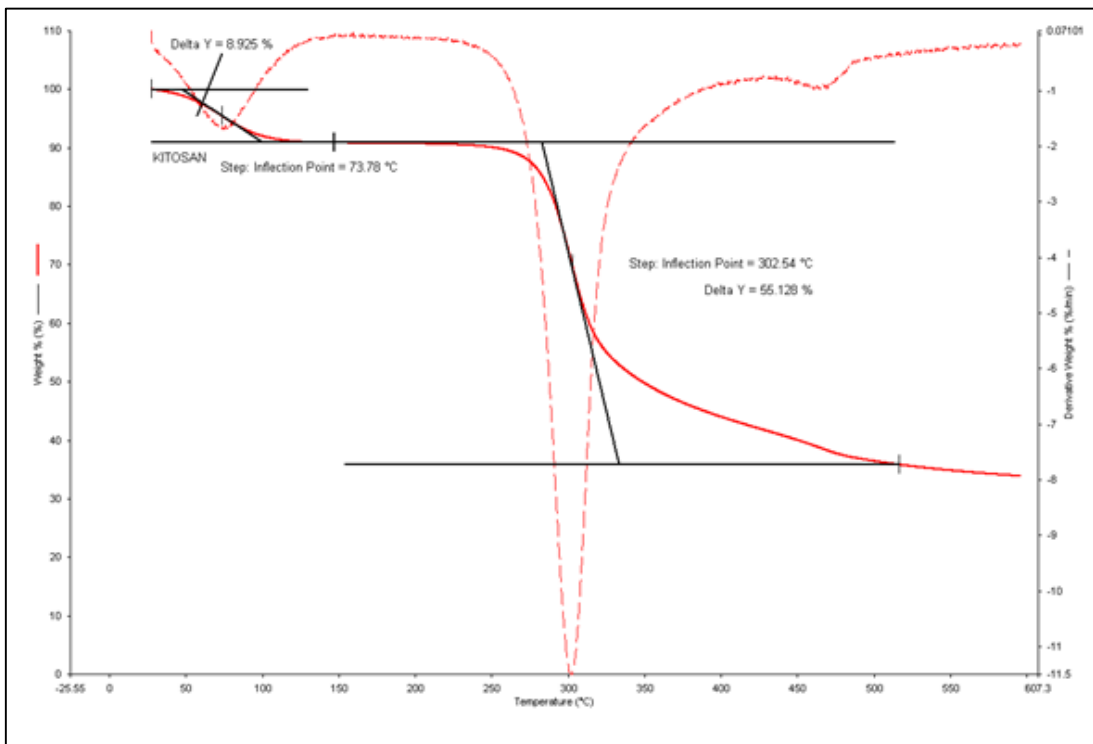
### Ek 4. Ticari kitin ve kitosanın (Sigma, Aldrich) FT-IR spektrumu



### Ek 5. Ticari kitinin TGA grafiği



### Ek 6. Ticari kitosanın TGA grafiği





## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : İlkay Koçer  
Doğum Yeri : Üsküdar  
Medeni Hali : Bekar  
E-posta : ilkaykocer@hacettepe.edu.tr  
Adresi : Eryaman Mah., 271. Sok., Blok A1, Daire 23 Etimesgut/Ankara

### Eğitim

Lise : 2003-2007 Süleyman Demirel Anadolu Lisesi  
Lisans : 2007-2012 Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü  
Yüksek Lisans : 2012-2015 Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü  
Doktora :

### Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce – İleri

### İş Deneyimi

Temmuz 2010 – Ağustos 2010 : Stajyer, TUSAŞ, Arıtma Tesisleri  
Ağustos 2013 – : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı

### Deneyim Alanları

Biyoteknoloji, genetik mühendisliği, biyopolimerler

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçeleri

013 D11 602 002 Numaralı, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Araştırma Projesi, Bütçe: 18,880 TL

014 D09 602 010 Numaralı, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Araştırma Projesi, Bütçe: 18,900 TL

### Tezden Üretilmiş Yayınlar

### Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Koçer İ., Çelik E. ve Ersan H. Y., Mikroorganizmalardan Kitosan Eldesinde Verimin Arttırılması, 11. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Poster Sunumu, 2-5 Eylül 2014, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Bildiri Özetleri Kitabı, sayfa 24-25.