

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**





KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORCID : - - -

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

ORCID : - - -

Trabzon

ÖNSÖZ

“Viral ve Bakteriyel Kitinazların İnsektisidal Aktivitelerinin Karşılaştırılması; Kitinazın Viral İnfektiviteye Etkisi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, hiç yabancılık hissettermeyen sayın hocam Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, çalışmam boyunca değerli fikirlerini benden esirgemeyen ve tüm imkânları sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, çalışmam boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Dr. Aydın YEŞİLYURT ve Dr. Dönüş GENÇER’e, tezimdeki yardımlarından dolayı başta Dr. Aşkın TEKİN ve Soner KARABULUT olmak üzere diğer Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma ve çalışmalarımnda faydalandığım Moleküler Biyoloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm varlıklarını benim eğitimim için feda ederek bana her zaman yol göstermiş olan babama, sevgisiyle bana her zaman güç veren anneme ve ailemin diğer bireyelerine sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca yüksek lisan eğitimimi destekleyen Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı’na teşekkür ediyorum.

Abulikemu SULAIMAN

Trabzon 2020

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Viral ve Bakterial Kitinazların İnsektisidal Aktivitelerinin Karşılaştırılması; Kitinazın Viral İnfektiviteye Etkisi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 09/07/2020

Abulikemu SULAIMAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	IV
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Biyopestisitler.....	1
1.3. Enzimler	2
1.3.1. Enzimlerin Yapısı.....	3
1.3.2. Enzimlerin Kullanımı.....	4
1.4. Kitinaz Enziminin Biyolojik Kontrol Materyali Olarak Kullanılması	5
1.5. Kitin Degredasyonu	6
1.5.1. Kitin	6
1.5.2. Kitinazlar.....	7
1.5.3. Kitinazların organizmalardaki görevleri	10
1.6. Kitinazların Kullanımı	11
1.6.1. Zararlı Böceklerin ve Fitopatojenlerin biyokontrolü	11
1.6.2. Tek Hücre Proteini Üretimi	12
1.6.3. Gıda Muhafazası.....	13
1.6.4. Mantar Biyokütle Tahmini	13
1.6.5. Sivrisinek Kontrolü.....	13
1.6.6. Protoplastların İzolasyonu.....	14
1.6.7. Tıbbi Uygulama.....	14

1.6.8.	Kitooligosakkaritler, Glukozaminler ve N-asetilglukozamin (GlcNAc) Üretimi	14
1.6.9.	Morfogenezis.....	14
1.6.10.	Alerjik İnflamasyon	15
1.7.	Bakülovirüsler'in Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak Kullanılması	15
1.8.	<i>Serratia marcescens</i> 'in Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak Kullanılması.....	17
1.9.	Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6)	18
1.10.	Entegre Zararlı Yönetimi	18
1.11.	Çalışmanın Amacı.....	19
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	20
2.1.	Çalışmada Kullanılan Virüsler	20
2.2.	Viral DNA İzolasyonu.....	20
2.3.	Primerlerin Tasarlanması.....	21
2.4.	Kitinaz genlerinin PCR aracılığıyla çoğaltılması	22
2.5.	Kitinaz Genlerinin pJET1.2 Vektörüne Klonlanmaları.....	22
2.6.	Kompotent <i>E. coli</i> DH10 β Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon	23
2.7.	Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi	24
2.8.	Kitinaz Genlerinin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanmaları.....	25
2.9.	Kitinaz Genlerini İçeren pET28a Vektörlerinin <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonları.....	26
2.10.	Kitinaz Proteinlerinin ifade Edilmesi	27
2.11.	Proteinlerin Saflaştırılması ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	27
2.12.	Kitinaz Proteinlerinin Analizi.....	28
2.12.1.	SDS-PAGE Analizi	28
2.12.2.	Western-blot Analizi	29
2.13.	Proteinlerin Diyalizi.....	30
2.14.	Proteinlerin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	31
2.15.	Kitinaz Proteini ve Virüs Karşımının İnsektisidal Etkisinin Test Edilmesi	31
3.	BULGULAR	32
3.1.	Viral kitinaz Genlerinin PCR ile Çoğaltılması	32

3.2.	Viral kitinaz Genlerinin Klonlanması	32
3.3.	Protein Ekspresyonu ve Analizi.....	33
3.4.	Kitinaz Proteinlerinin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	35
3.5.	İnsektisidal Aktivite Sonuçlarının LC ₅₀ Değerleri	36
3.6.	İnsektisidal Aktivite Sonuçlarının LT ₅₀ Değerleri	36
3.7.	Kitinaz ve Virüs Karşınımın İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	37
4.	TARTIŞMA.....	39
5.	SONUÇLAR	43
6.	ÖNERİLER.....	46
7.	KAYNAKLAR	46
	ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

VİRAL VE BAKTERİYEL KİTİNAZLARIN İNSEKTİSİDAL AKTİVİTELERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI; KİTİNAZIN VİRAL İNFEKTİVİTEYE ETKİSİ

Abulikemu SULAIMAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

2020, 53 Sayfa

Sentetik pestisitlerin yoğun kullanımının çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri, bitki hastalıkları ve zararlılarının kontrolünde çevre dostu uygulamalar arayışını teşvik etmiştir. Bunlar arasında, mikroorganizmalar veya bunların ürünlerinin kullanılması ön plana çıkmaktadır. Kitinazlar zararlı organizmaların kontrolünde kullanılacak önemli mikrobiyal ürünlerdir. Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6) önemli bazı zararlı böceklerde enfeksiyon oluşturan bir böcek virüsüdür. Ancak IIV6'nın oral infektivitesi oldukça düşüktür. Bu çalışmada viral ve bakteriyel kitinazların insektisidal aktiviteleri karşılaştırılmış ve IIV6'nın oral infektivitesine kitinaz proteininin katkısı araştırılmıştır. Bu işlem için *Autographa californica* *nucleopolyhedrovirus* (AcNPV) ve *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV)'e ait kitinaz genleri, pET-28a ekspresyon vektöründe ifade edildiler. Bu iki virüse ait kitinaz proteinleri ve daha önce klonlanması yapılmış *Serretia marcescens* kitinaz C proteinlerinin insektisidal aktiviteleri test böceği *Galleria mellonella* üzerinde araştırıldı. Sonraki adımda kitinaz proteininin IIV6'nın oral infektivitesini arttırıp arttırmadığı yine *G. mellonella* larvaları üzerinde araştırıldı. Sonuçlar, CpGV kitinaz proteininin *G. mellonella* larvaları üzerinde en yüksek mortaliteye neden olduğunu gösterdi. *S. marcescens* kitinazı ise AcNPV kitinazına nispeten biraz daha yüksek mortalite oluşturmuştur. Ayrıca, kitinaz proteini ile birlikte uygulanan IIV6'nın, tek başına test edilen IIV6'dan daha fazla insektisidal etki gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kitinaz, Invertebrate iridescent virus (IIV6) , İnksektisidal aktivite, Biyolojik kontrol

Master Thesis

SUMMARY

COMPARISON OF INSECTICAL ACTIVITIES OF VIRAL AND BACTERIAL
KITINASES; THE EFFECT OF KITINASIS ON VIRAL INFECTIVITY

Abulikemu SULAIMAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU
2020, 53 Pages

The negative impact of the massive use of synthetic pesticides on the environment and on human health has stimulated the search for environment-friendly practices for controlling plant diseases and pests. Among them, microorganisms and their products come to the fore. Chitinases are important microbial products that can be used to control of harmful organisms.. Invertebrate iridescent virus 6 (IIV-6) is an insect virus that causes infection in some important pests. However, IIV6 is lowly infectious by oral ingestion. In this study, the insecticidal activities of viral and bacterial chitinases were compared and the contribution of chitinase protein to the oral infectivity of IIV6 was investigated. For this study, the chitinase encoding genes of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV) and *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) were expressed in pET-28a expression vector. The insecticidal effects of chitinase proteins of these two viruses and *Serratia marcescens* chitinase C protein, which was previously cloned, were evaluated on test insects *Galleria mellonella*. The next step whether the chitinase protein increased the oral infectivity of IIV6 was also investigated on *Galleria mellonella*. Results showed that CpGV chitinase protein caused the highest mortality effect on *G. mellonella* larvae. The chitinase from *S. marcescens* has relatively higher mortality effect than AcNPV chitinase. As well as, IIV6 implemented with chitinase, produced more insecticidal effect than the IIV6 tested alone.

Key Words: Chitinase, Invertebrate Iridescent Virus 6 (IIV-6), Insecticidal activite, Biological control

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Kitinin molekül formülü	6
Şekil 2. Kitinaz ve Kitobiozun molekül formülleri	8
Şekil 3. Uniport databankasında bulunan kitinaz sıralarının organizmalara göre dağılımı	9
Şekil 4. Viral DNA izolasyon basamakları	21
Şekil 5. PCR ile çoğaltılmış AcNPV ve CpGV kitinaz genlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü	32
Şekil 6. AcNPV ve CpGV kitinaz genlerini taşıyan rekombinant pET28(+) plazmitleri	33
Şekil 7. Saflaştırılmış <i>Serretia marcescens</i> , AcNPV ve CpGV kitinaz proteinlerinin Coomassie Brilliant Blue ile gösterilmesi.	34
Şekil 8. <i>Serretia marcescens</i> , AcNPV ve CpGV kitinaz proteinlerinin western-analizi.	35
Şekil 9. Saflaştırılmış AcNPV-kit, CpGV-kit ve <i>S. marcescens</i> -kitC proteinlerinin farklı konsantrasyonlarda, <i>Galleria mellonella</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkileri.	36
Şekil 10. Saflaştırılmış AcNPV-kit, SpGV-kit ve <i>S. marcescens</i> -kitC proteinlerinin zamana bağlı olarak <i>Galleria mellonella</i> larvaları üzerindeki ölüm oranları.	37
Şekil 11. Saflaştırılmış <i>S. marcescens</i> -kitC proteini ve IIV6'nin <i>Galleria mellonella</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi.	38

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. AcNPV ve CpGV nin kitinaz genlerine ait primer dizileri	22
Tablo 2. AcNPV-kit , SpGV-kit ve <i>S. marcescens</i> -kit C proteinlerinin LC50 değerleri.....	36
Tablo 3. AcNPV-kit, SpGV-kit ve <i>S. marcescens</i> -kit C proteinlerinin LT50 değerleri.....	37



SEMBOLLER DİZİNİ

AcNPV	: Autographa californica nükleopolihedrovirüs
BEVS	: Bakülovirüs ekspresyon vektör sistemi
bp	: Baz çifti
CIV	: Chilo iridescent viru
chit	: Kitinaz
CpGPV	: Cydia pomonella granulovirus
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
DNS	: Dinitrosalisilik asit
dNTP	: Deoksinükleosit trifosfat
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
GlcNAc	: N-Asetylglukosamine
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosit
IPM	: Entegre zararlı yönetimi
kDa	: Kilo dalton
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil β -D-galaktopiranosid

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Hızlı bir şekilde artan dünya nüfusu son 50 yılda iki katına çıkmıştır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne göre 2050 yılında bu sayının 10 milyar civarına ulaşacağı tahmin edilmektedir (Alexandratos ve Bruinsma, 2012). Değişen çevresel koşullar ve mevcut tarım arazilerindeki azalma sürekli artan nüfusu beslemek için yeterli gıda üretimini olumsuz yönde etkilemektedir.

Mahsul verimliliğini en üst düzeye çıkaran tarımsal uygulamalar insanların artan gıda talebini karşılamak için vazgeçilmezdir. Bu uygulamalar arasında yeni tarımsal teknolojilerin uygulanması, yüksek verimli bitki çeşitlerinin geliştirilmesi, gübreleme, bitki patojenleri ve yabancı otlar için böcek ilacı ve herbisit kullanımı yer almaktadır (Hardy, 2014; Parnell vd., 2016). Mevcut raporlara göre 65.000'den fazla farklı bitki zararlısı türü bilinmektedir (Chandler vd., 2011). İnsanlar bu patojenleri kontrol altına almak için dünya çapında yılda 2,3 milyar kg'dan fazla böcek ilacı kullanmaktadır (Atwood ve Paisley-Jones, 2017).

1.2. Biyopestisitler

Kimyasalların ekosistem ve insan sağlığı üzerindeki etkisi herkes tarafından bilinmektedir. Kimyasal pestisitlerin zararlarından kurtulmak amacı ile insanlar biyopestisitlerin kullanımına doğru yönelmişlerdir. Biyopestisitlerin, sentetik pestisit pazarını 2040'ların sonu ile 2050'lerin başı arasında eşitleyeceği ve daha sonra yerini alacağı tahmin edilmektedir.

Son sınıflandırmalara göre biyopestisitlerin üç farklı ürün türü bulunmaktadır (Czaja vd., 2015; Olson, 2015). Bunlar;

(1) Canlı organizmaların tarımda direk uygulanması; günümüzde, satışta olan ve kullanılan birçok biyokontrol ajanı bulunmaktadır. Bu ajanlardan mikroorganizmaları kullanmanın bir dezavantajı ise, organizmaların etkinliklerinin, değişen alan koşulları ve yerleşik olarak bulunan mikrobiota tarafından etkilenmesidir.

(2) Genetiği değiştirilmiş ürünlerin kullanımı; Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılan ve içeriğinde 31 aktif koruyucu bileşen içeren ürün mısır, pamuk, soya fasulyesi, patates, papaya ve erik bitkilerinin korunması için onay almıştır. Ancak transgenik bitkilerin kullanımının, sıkı yasal düzenlemelere gereksinimi ve genetiği değiştirilmiş organizmaların halk tarafından kabul görmemesi nedenleriyle kullanımı sınırlıdır.

(3) Mikrobiyal enzimler ve metabolitlerin kullanımı; bu kategori, glukanlar, proteazlar, lipazlar ve kitinazlar olarak bilinen mikrobiyal sekonder metabolitleri ve hidrolitik enzimleri içerir. Bu moleküller tek başlarına veya bileşimler halinde kullanılabilirler.

1.3. Enzimler

'Enzim' kelimesi ilk kez Alman fizyoloğu Wilhelm Kühne tarafından 1878 yılında mayanın şekerlerden alkol üretme kabiliyetini tarif ettiği sırada kullanılmış ve Yunanca "en" (içeride) ve "zume" (anlam) kelimelerinden türetilmiştir. Enzimler, canlı organizmalarda oluşan tüm biyokimyasal reaksiyonların hızlı bir şekilde koordine edilmesini sağlayan protein yapılı spesifik biyolojik katalizörlerdir. Hücrelerden izole edilebilir ve çok çeşitli işlemleri katalize etmek için kullanılabilirler. Örneğin; tatlandırıcı üretiminde ve antibiyotiklerin modifikasyonunda önemli rolleri vardır. Çeşitli temizlik ürünlerinde kullanılmakla beraber, klinik, gıda ve çevresel uygulamalara sahip analitik cihazlarda ve analizlerde kilit rol oynarlar.

Enzimler, tarihten günümüze kadar insanlığa hizmet etmiş olup ilk biyoteknolojik işlemler olarak bilinen ekmek, yoğurt, bira, şarap, peynir gibi ürünlerin üretilmesinde farkında olmadan kullanılmışlardır (Haki ve Rakshi, 2003). On sekizinci yüzyıldan itibaren ise enzim alanında yapılan çalışmalar artmıştır. On dokuzuncu yüzyılın sonlarında ve

yirminci yüzyılın başlarında, birçok enzimin izolasyonu, karakterizasyonu ve ticarileşmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. 1920'lere gelindiğinde ise enzimler kristalleştirilmiş ve bu gelişme katalitik aktivitenin protein molekülleri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Neelam vd., 2013).

Enzimlerin gerçekleştirdiği reaksiyonlar diğer kimyasal reaksiyonlardan 100 milyon ila 10 milyar kat daha hızlı olabilir. Bu durum da enzimlerin oldukça verimli olduklarını göstermektedir. Rekombinant teknoloji ve protein mühendisliğindeki gelişmeler ile enzimler, farklı endüstriyel ve terapötik amaçlarda yaygın olarak kullanılan önemli moleküller olarak geliştirilmiştir. Günümüzde, mikrobiyal enzimler, enzim teknolojisinin hızlı gelişimi ile büyük ilgi görmektedir. Mikrobiyal enzimler, ekonomik fizibiliteleri, yüksek verimlilik ve tutarlılıkları, ürün modifikasyonu ve optimizasyon kolaylığı, mevsimsel dalgalanmaların olmaması nedeniyle düzenli tedarik edilebilmeleri, mikroorganizmaların ucuz ortamlarda hızlı büyütülebilmeleri nedenleriyle tercih edilmektedir. Mikrobiyal enzimler, çeşitli hastalıkların teşhisi, tedavisi, biyokimyasal araştırmasında ve izlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Hayvan ve bitki kaynaklarından elde edilen enzimlerle karşılaştırıldığında, mikrobiyal enzimlerin stabilitesi genellikle yüksektir (Neelam vd., 2013).

1.3.1. Enzimlerin Yapısı

Enzimler genel olarak protein yapısında moleküller olup genler tarafından kodlanmaktadır. Proteinleri oluşturan amino asit dizilimi her enzim için kendine özgüdür. Enzimler, apoenzim denilen protein kısmı ile ona yardımcı kofaktör kısmından oluşmaktadır. Kofaktör organik ise koenzim adını almaktadır. Apoenzim ve kofaktörün birlikte oluşturduğu yapıya ise holoenzim denilmektedir. Genel olarak bazı enzimler sadece apoenzim kısmından (pepsin, tripsin, üreaz, bazı hidrolazlar) oluşurken, çoğunluğu ise hem apoenzim hem de kofaktör kısmını içermektedir.

Yapıda ki protein kısmı enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar. Kofaktör kısmı

ise protein kısma yardımcı olan ve kendisi proteinden oluşmayan moleküllerdir. Organik ya da inorganik yapıda olabilmenin yanı sıra, protein kısmı ile karşılaştığımızda çok daha küçük yapıdadır. Enzimde işlev gören ve esas iş yapan bu kısımdır. Analize göre, koenzim kısmının birçok vitamini bünyesinde bulundurduğu belirlenmiştir. Bütün vitaminler canlılarda enzimlerin koenzim kısmı olarak görev yapar. Bazı enzimler ortama yalnız belirli iyonlar eklendiğinde etkin olabilmektedirler. Örneğin glukozun laktik aside çevrilebilmesi için ortama Mg^{++} iyonunun eklenmesi gerekmektedir. Bazı durumlarda da enzimin görev yapabilmesi için bir metal iyonuna ihtiyaç olmaktadır. Bir koenzim, enzimin aktif bölgesini katalitik aktiviteye hazır hale getirir ve substrat molekülünden fonksiyonel grupları kaldırarak bir başka substrat molekülüne ekler. Hatta bazı koenzimler elektron taşıyıcı olarak görev yapar ve elektronları bir substrattan alır ve takibeden reaksiyonda bir başka moleküle ekler.

Enzimler etki bölgesi, etki tipi ve substrat'a göre adlandırılır veya sınıflandırılır. Genelde substrat kelimesinin sonuna "az" eklenerek adlandırılır. Uluslararası Biyokimya Birliği'nin enzim komisyonunca 1961 yılında yayımlanan kararına göre enzimler oksido-redüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar olarak 6 gruba ayrılmaktadır (Peter,2015).

1.3.2. Enzimlerin Kullanımı

Bitkisel, hayvansal ve mikro organizma kaynaklı enzimler günümüzde tarım, hayvancılık, gıda, kâğıt, tekstil, deterjan, klinik, tıp ve eczacılık gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Potansiyel enzim kaynağı olarak kolay çoğalabilmeleri, enzim oluşumunun kolay kontrol edilebilmesi gibi nedenlerden dolayı mikroorganizmalar sıkça tercih edilirler. Nitekim günümüzde endüstriyel üretimde kullanılan enzimlerin pek çoğu mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlere göre aktivitelerinin yüksek olması, arzu edilmeyen ara ürün oluşturmamaları, yüksek stabilite göstermeleri, ucuz olmaları ve büyük çapta elde

edilebilmeleri bakımından avantajlara sahiptirler (Wiseman, 1987). Üretilen enzimler gıda (%45), deterjan (%35), tekstil (%10) ve deri (%3) endüstrilerinde kullanılmaktadır (Saurabh, 2018). Görüldüğü gibi biyoteknoloji alanındaki gelişmelerle elde edilen enzimlerin kullanımının en fazla olduğu alan gıda sektörüdür. Proteazlar ve amilazlar bu alanda en çok kullanılan enzimlerdir. Eczacılıkta da enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, hazım kolaylaştırıcı bazı ilaçların bileşiminde proteaz, selüloz, lipaz ve laktaz gibi enzimler bulunmaktadır.

Yine enzim kullanımının en fazla olduğu alanlardan biriside deterjan endüstrisidir. Deterjanlar kullanılacakları alana göre bileşimi değişen kompleks karışımlardır. Bazı deterjanlar alkali koşullarda aktivite gösteren alkali-proteaz (bazik) enzimlerini içerirken, bazı deterjanların yapımında da amilaz ve lipazlar kullanılmaktadır. Bu enzimlerin etkisi ile özellikle protein, yağ ve nişastanın tesiriyle oluşan kirlilik etkisi bir şekilde temizlenmektedir. Deri işlemede ve deri endüstrisinde de enzimlerden yararlanılmaktadır (Neelam vd., 2013).

Yapılan pek çok araştırma sonucunda, enzimlerin uygulama alanları gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle rekombinant-DNA teknolojisi sayesinde yeni ve istenilen özelliklerde enzim elde edilmesi mümkün olmaktadır. Buna bağlı olarak da enzim kullanımının giderek yaygınlaşacağı düşünülmektedir.

Biyolojik mücadelede kitinaz, glukaz, proteaz ve selülazlar gibi hücre duvarı bozunduruca enzimler tercih edilmektedir (Hermosa, vd., 2000).

1.4. Kitinaz Enziminin Biyolojik Kontrol Materyali Olarak Kullanılması

Bakteri, virüs ve mantar gibi mikroorganizmalar kitinolitik aktivite göstermektedir. Bu mikroorganizmalar veya bunlardan elde edilecek kitinaz enzimleri biyopestisit olarak kullanılabilir. Biyopestisit olarak kitinaz gibi mikrobiyal enzimlerin kullanımı canlı organizmaların kullanımına göre daha avantajlıdır (Huang ve Chen, 2008; Karasuda vd., 2003). Enzimleri kodlayan genlerde protein mühendisliği yöntemleriyle iyileştirmelerin

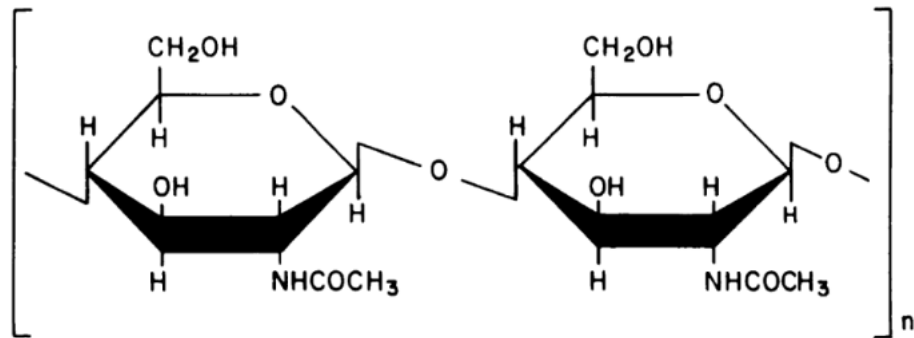
yapılabilmesi bu avantajlardan sadece biridir. Kitinazlar, biyopestit olarak tek başlarına kullanılabildiği gibi kombinasyonlar halinde de kullanılabilirler.

Kitinin doğadaki yaygın dağılımı sayesinde son zamanlarda böcek, mantar ve nematodların aynı anda kontrol edebileceği entegre zararlı yönetimi (IPM) stratejilerinde biyopestitler, umut verici olarak dikkat çekmektedir (Berini vd., 2016, 2017a; Hjort vd., 2014). Kitinazlar zararlı böceklerin peritrofik matriks ve kutikülünde, nematodların yumurta kabuğunda ve fungal fitopatogenlerin hücre duvarında bulunan kitin üzerine etki ederek bu yapıları parçalarlar. Kitinazlar, kitin içermeyen bitki ve omurgasızlar için zararsızdırlar. Bu nedenle IPM için glukazlar veya proteazlar gibi diğer hidrolitik enzimlere göre daha büyük bir potansiyele sahiptirler (Neeraja vd., 2010).

1.5. Kitin Degredasyonu

1.5.1. Kitin

Kitin, β -1,4 bağları ile bağlı N-asetil-D-glukozamin (GlcNAc) homopolimeri olan, selülozdan sonra en bol yenilenebilir doğal kaynaktır (Deshpande, 1986). Kitin doğada, böceklerin bağırsak membranlarında ve iskeletlerinde, kabuklu böceklerin dış kabuklarında, nematodlarda yumurta kabuğunda ve yutak yapısında, mantar hücre duvarlarında yapısal bir polisakkarit olarak bulunmaktadır. Kitinin yapısı şekil 1’de gösterilmektedir.



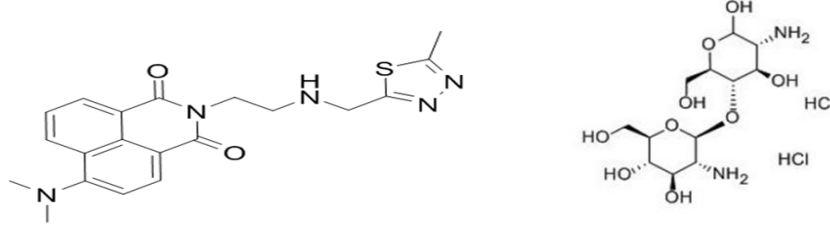
Şekil 1. Kitinin molekül formülü (John ,1984)

Karides, yengeç ve kril gibi kabuklu deniz hayvanlarının toplam ağırlığının yaklaşık %75' i atık olarak kabul edilir. Bu atığın kuru ağırlığının %20-58'ini kitin oluşturur (Wang ve Chang 1997). Deniz omurgasızlarının işlenmesinden kaynaklanan dünya çapında yıllık kitinin miktarının 37.300 ton olduğu tahmin edilmektedir (Shaikh ve Deshpande, 1993).

Kitin, biyokimya, gıda ve çeşitli kimya endüstrilerinde geniş bir uygulama alanına sahip olup antimikrobiyal, antikolesterol ve antitümör aktiviteleri vardır (Patil vd., 2000; Gooday, 1999). Kitin ve türevleri atık su arıtma (Flach vd., 1992), ilaç elde etme (Kadowaki vd., 1997), yara iyileşmesi ve diyet lifi (Muzzarelli, 1977; Muzzarelli vd., 1999) olarak da kullanılmaktadır. Bunun yanında biyoteknolojik uygulamaları bulunmaktadır. İmmünadjuvan, atıksu arıtma ve tarımda kullanımları gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olmaları kullanılabilirliklerini yaygınlaştırmaktadır (Flach vd., 1992). Kitinin enzimatik deasetilasyonu yolu ile oluşturulan polimer yapısındaki kitozanda endüstri ve sağlık alanlarında oldukça önemli rollere sahiptir. Örneğin, kitozanın serum kolestrol oranını düşürdüğü hakkında bilgiler mevcuttur (da Silva Amorim vd., 2001).

1.5.2. Kitinazlar

Kitinolitik enzimler olan kitinaz ve kitobiaz (Şekil 2), kitinin N-acetyl- β -D-glucosamin (NAG) birimlerine hidrolizini sağlarlar. Kitinaz kitinde ki β -1,4 glikosidik bağlarını hidrolize ederek dimer veya trimer yapıda ki NAG oligomerlerini oluşturur. Bu oligomerler daha sonra kitobiase tarafından monomer yapıdaki NAG birimlerine hidroliz edilirler (Bhattacharya vd., 2007; Muzzarelli, 1977).



Şekil 2. Kitinaz ve Kitobiozun molekül formülleri (URL-1, 2020)

Etki tarzına bağlı olarak, kitinazlar Endokitinazlar ve Ekzokitinazlar şeklinde iki sınıfa ayrılır. Endokitinazlar, kitin zincirini iç kısmından rastgele keserek, çözünebilen, düşük moleküler ağırlıkdaki N-asetilglukozaminin (GlcNAc) multimerlerini oluşturur. Kitotetraose, kitotriose ve diasetilkitobiozlar endokitinazlara örnek olarak verilebilir. Ekzokitinazlar ise, GlcNAc monomerlerinin (β -N-asetil glukozaminidazlar) veya dimerlerin (kitobiosidazlar) kitin zincirinin indirgenmemiş ucundan veya endokitinazların oligomerik ürünlerinden ardarda çıkarılmasını katalize eder (Adrangi ve Faramarzi, 2013).

Amino asit sekansına dayanarak kitinazlar, GH18, GH19 ve GH20 şeklinde üç farklı glikozit hidrolize (GH) ailesine ayrılır. GH18 ve GH19 glikozidaz aileleri kitinaz olarak kabul edilir, çünkü kitin polimerlerinin bozulmasını katalize ederler. GH20 ailesi ise, dimerik N-asetilglukosamin (Chitobiose), terminal N asetilgalaktosamin veya glukozaminin gliko-konjugatlardan parçalanmasını katalizleyen kitobiaz ve β -N asetilheksosaminidaz içerir (Patil vd., 2000). GH18 ailesi, evrimsel açıdan çeşitlidir ve bakteri, mantar, virüs, hayvan ve bazı bitki kitinazlarından gelen kitinazları içerir. GH19 ailesi ise, bitki kitinazlarından ve bazı Streptomyces kitinazlarından oluşur (Hart vd., 1995)

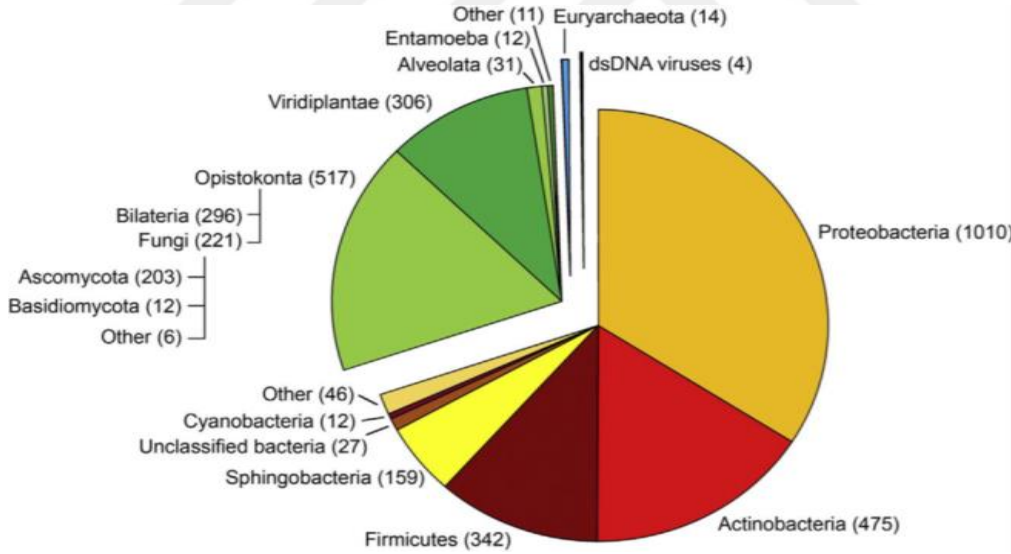
GH18 ve GH19 ailelerine ait kitinazların amino asit dizileri birbirine benzememektedir. Bu kitinazlar, farklı atalardan evrimleştikleri için birbirinden tamamen farklı 3 boyutlu yapı ve moleküler mekanizmaları vardır (Suzuki vd.,1999). GH20 üyeleri, bakteriler, Streptomiset ve insanlardan gelen p-N-asetil-heksosaminidazları içermektedir.

Kitinazlar ayrıca gen dizilimine göre roma rakamları ile belirtilen 5 sınıfa

ayrılmaktadırlar. I, II ve IV grubunda olanlar bitki kökenlidir ve grup 19'a aittirler. Grup III' de olanlar bitki ve mantar kökenlidir ve grup V ile birlikte grup 18'i oluşturmaktadırlar. Grup V bakteriyel kitinazları içermektedir. Bakteriler, kitinazı besin ihtiyaçlarını karşılamak ve parazitizm için üretmektedirler. Ayrıca, doğadaki kitin çeşitliliği bakterilerin ürettiği farklı kitinazlar tarafından hidrolize edilmektedir (Cohen-Kupiec ve Chet, 1998).

1.5.2. Kitinaz Kaynakları

Kitinaz üretimi tüm canlı sınıflarına dağılmıştır (Şekil 3). Mikroorganizmalar (bakteri ve mantarlar) esas kitinaz üreticileridirler. Kitinazlar esasında böcek, virüs, bitki ve omurgalılar tarafından da morfogenez, patogenez, parazitizm ve savunma amaçlı olarak üretilmektedir.



Şekil 3. Uniport databankasında bulunan kitinaz sıralarının organizmalara göre dağılımı (Francesca vd., 2018)

Bakteriyel kitinazların çoğu grup 18 ailesinde bulunmasına rağmen, aktinomisetlerden ve mor bakterilerden gelen bazı kitinazlar grup 19 ailesine aittir. İki aileye ait enzimler, sekans, üç boyutlu yapı ve katalitik mekanizmalar bakımından farklıdır. Group 18 bakteriyel kitinaz ailesi katalitik alanlarının yapı benzerliğine göre A,

B ve C olmak üzere üç alt aileye ayrılır. B ve C alt familyaları sadece birkaç bakteride tanımlanmış olsa da A alt aile üyeleri doğada yaygındır.

Mantar kitinazlarının büyük çoğunluğu group 18 ailesine aittir. Tek istisna group 19 ailesindeki *Nosema bombycis*'e ait olan NbChiA'dır. Mantar grup 18 kitinazları da bakteriyel kitinazlar gibi, sekans benzerliklerine ve enzimatik aktivitelere göre A, B ve C alt ailelerine ayrılır. Bakteriyel kitinazların görevlerine ilaveten funguslarda, kitinazlar hücre bölünmesi, büyümesi ve morfogenezi sırasında mantar hücre duvarı modülasyonunda önemli rol oynar. Mantarlarda kitinazların rolü iyi bilinmektedir (Francesca vd., 2018).

Ancak mantarların kendilerini endojen kitinazların etkilerinden nasıl koruyabildikleri hala tam olarak anlaşılmamıştır.

Viral kitinazların hepsi group 18 ailesine aittir. Fonksiyonları, konakçı bariyer yapısını zayıflatarak virüs enfeksiyonunu kolaylaştırmak ve enfekte olmuş hücrelerden yeni çıkan virüsleri serbest bırakmaktır (Francesca vd., 2018).

1.5.3. Kitinazların Organizmalardaki Görevleri

Kitin içeren tüm organizmalardaki kitinaz enzimi hücre duvarının ve dış iskeletin morfogenezi için gereklidir. Kitin içermeyen organizmalarda ise kitinaz, kitin polimerlerini degrades ederek çeşitli amaçlara hizmet etmektedir (Roberts ve Selitrennikoff, 1988). Dolayısı ile kitinazlar bazı organizmalarda morfogenez ve besin döngüsünde bazılarında ise kitin içeren zararlılarla ve parazitlerle mücadelede görev yapar (Herrera ve Chet, 1999).

Bitkiler, kitinazı fungal patojenlere karşı kendilerini korumak için üretirler. Kitinaz geninin bitkilere transferi ile elde edilen transgenik bitkiler kendileri için patojen funguslarla ve böceklerle savaşabilmektedir. Kitinaz, omurgasızlarda dış iskeleti oluşturan kitinin parçalanmasında, omurgalılarda sindirimde, mantarlarda hücre yapılarının oluşmasında görev yapmaktadır. Virüsler ve bakterilerde ise, patogenezde beslenme ve parazitizmde rol oynar. Çeşitli habitatlarda bulunan kitinolitik bakteriler, kitini hem

aerobik hemde anaerobik koşullarda ayrıştırır. Deniz ortamlarında, eklembacaklı kabuklularından ve diğer kaynaklardan elde edilen kitin besin döngüsüne katılır (Souza vd.,2011). Toprakta ve rizosferde bulunan bakteriler karbon ve azot kaynağı olarak böcek ve mantarlarda bulunan kitini kullanırlar (Cohen vd., 1998)

1.6. Kitinazların Kullanımı

1.6.1. Zararlı Böceklerin ve Fitopatojenlerin Biyokontrolü

Zararlı böcekleri veya fitopatojenleri kontrol etmek için mikroorganizmaların veya enzimlerin kullanılması tarım için önemli bir yaklaşımdır. Kimyasallar ile kombinasyonlar halinde kitinazların kullanılması, bu ilaçların konsantrasyonunun azalmasına ve zararlı etkisinin hafifletilmesine neden olmaktadır (Dahiya vd., 2006).

Doğal olarak genotipinde kitinaz geni bulunduran tütün, arpa, turp gibi bazı bitkiler bilinmektedir (Taira vd., 2002). Böyle bitkilerin savunma mekanizmalarının daha verimli olduğu görölmektedir. Bu bilgiden hareketle, kitinaz geninin bitkilere transferi ile elde edilen transgenik bitkiler fungusit ve insektisit özellikler kazanmakta ve böyle transgenik bitkiler kendileri için patojen funguslarla ve böceklerle daha etkili mücadele edebilmektedir.

Kitinolitik bakterilerin kültür deneylerinde mantarların büyümesini in vitro olarak önledikleri (hücre duvarında ki kitine etki ederek) ve sera deneylerinde fitopatojenik mantarların neden olduğu bitki hastalıklarını iyileştirdikleri bilinmektedir (Swiontek vd., 2014). Chernin ve arkadaşları (1995), bitki patojeni *Rhizoctonia solani* fungusu ile enfekte olmuş pamuğun tedavisi için en az dört farklı kitinaz salgılayan üç *Enterobacter agglomerini* suşunu test etmişlerdir. Pamuk tohumları bakteri süspansiyonu ile karıştırılarak ekilmiş, sonuçta patojenden kaynaklanan kök çürüklük hastalığının %64 ila %86 arasında azaldığı gözlenmiştir. Kitinolitik aktivitesi olmayan bir izolatın, bitkileri hastalığa karşı koruyamadıkları gösterilmiştir.

Literatürde, viral kaynaklı kitinaz A proteininin, *Botrytis cinerea* ve *Alternaria alternata* fungusları üzerinde fungisidal aktivite sergilediği gösterilmiştir (Corrado vd., 2008).

Böcekler, kitinaz etkisi için iki potansiyel hedefe sahiptirler. İlk hedef böceğin dış yüzeyini örten kütikul tabakası, ikinci hedef ise böcek bağırsak yapısında bulunan peritrofik matriksleridir. *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria* ve *Trichoderma* cinslerine ait mantarların sahip oldukları kitinazlar, böceklerin kütikul tabakasına doğrudan etki ederler. *S. marcescens* WW4 suşundan elde edilmiş üç kitinaz (ChiA, ChiB ve ChiC) proteini muhtemelen peritrofik matriks yapısında ki kitini parçayarak *Malacosoma neustria* ve *Helicoverpa armigera* larvaları üzerinde öldürücü etki göstermiştir (Danışmazoğlu vd., 2015). Chandrasekaran vd., (2012) *B. subtilis*'ten saflaştırılmış bir kitinazın, oral alımdan sonra *Spodoptera litura* larvalarının gelişimini azalttığını, Prasanna vd., (2013) de *Brevibacillus Laterosporus* Lak1210'dan elde edilen kitinazın *Plutella xylostella* larvaları üzerinde öldürücü etki oluşturduğunu göstermiştir.

Kitinaz ürünlerinin uygulanmasında en önemli nokta uygun formülasyonları oluşturmaktır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, kitinazların sulama suyuna veya toprağa karıştırılabileceği ve çimlenme sırasında tohumun etrafını kaplayarak koruma amaçlı kullanılabileceği önerilmiştir. Başka bir olası çözümde, doğrudan bitkilere püskürtülmeleridir. Seçilen kitinazların arzu edilen özellikleri, uygulama şekline ve diğer pestisitlerle birlikte uygulanmalarına bağlı olarak değişebilir

1.6.2. Tek Hücre Proteini Üretimi

Kabuklu deniz hayvanlarının işlenmesinden elde edilen katı atık esas olarak kitin, CaCO_3 ve proteinden oluşmaktadır. Revah-Moiseev ve Carrod (1981), kabuklu deniz hayvanı atıklarındaki kitinin, kitinolitik enzimler aracılığı ile maya tek hücre proteinine (SCP), biyolojik olarak dönüştürülmesi için kullanılabileceğini önermiştir.

1.6.3. Gıda Muhafazası

Mikroorganizma ve enzimlerin gıda muhafazasında kullanılması gıdanın beslenme değerine zarar vermeden, raf ömrünü arttıran kimyasal kalıntı problemi olmadan gıdayı koruyan doğal yöntemlerdir. Küflerin hücre duvarlarında bulunan en zengin bileşenler kitin ve glukandır. Mayaların hücre duvarlarında ise β -1,3 glukana ve mannan yaygındır. Bu nedenle gıda bulaşanı olan küf ve maya hücrelerinin parçalanmalarında kitinaz ve glukana enzimleri kullanılabilirler. Hatta çoğu zaman daha fazla antimikrobiyal etki için bu iki enzim birlikte kullanılır.

1.6.4. Mantar Biyokütle Tahmini

Kitinaz aktivitesi ile topraklardaki mantar popülasyonu arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Diğer taraftan bu korelasyon bakteri ve aktinomysetler arasında bulunamamıştır. Bu nedenle, kitinaz aktivitesi toprakta aktif olarak büyüyen mantarların uygun bir göstergesi gibi görülmektedir. Benzer şekilde, kitinaz ve kitin bağlayıcı proteinler insanlarda mantar enfeksiyonlarının tespiti için kullanılabilir (Line ve Lo, 1996).

1.6.5. Sivrisinek Kontrolü

Sivrisinekler tarafından yayılan hastalıkların dünya çapında sosyoekonomik yönlerine bakıldığında, sivrisinekleri çeşitli haşere kontrol ajanları için potansiyel hedefler haline getirmiştir. *Aedes aegypti*'nin hem birinci hem de dördüncü evre larvalarının, saprofit bir mantar olan *Myrothecium verrucaria*'dan elde edilen ham preparatın yardımı ile 48 saat içinde öldürülebileceği gösterilmiştir (Mendonsa vd., 1996).

1.6.6. Protoplastların İzolasyonu

Mantar protoplastları, hücre duvarı sentezi, enzim sentezi ve sekresyonun yanı sıra biyoteknolojik uygulamalar için suş iyileştirilmesi çalışmalarında etkili bir deneysel araç olarak kullanılmıştır. Mantarlar hücre duvarlarında kitin içerdiğinden, kitinazlar diğer duvar bozucu enzimler ile birlikte mantarlardan protoplast oluşumu için kullanılabilir (Hobel vd., 2005).

1.6.7. Tıbbi Uygulama

Kitinaz ve mikrobiyosit karışımları ile oftalmik preparatlar hazırlanıp tıbbi olarak kullanılabilirler. Fungal hastalıklar ile mücadelede, antifungal ilaçların aktivitesini kuvvetlendirmede kitinazların doğrudan tıbbi kullanımı önerilmiştir. Ayrıca antifungal kremlerde potansiyel katkı maddeleri olarak ve topikal uygulamalarına göre de losyon olarak kullanılabilirler.

1.6.8. Kitoooligosakkaritler, Glukozaminler ve N-asetilglukozamin (GlcNAc) Üretimi

Kitinazın kitini hidrolizi ile oluşan kitoooligosakkaritler, glukozaminler ve GlcNAc farmasötik potansiyele sahiptirler. Kitoooligosakkaritler, insan ilaçlarında potansiyel olarak faydalıdır. Örneğin, kitoheksoz ve kitoheptoz, antitümör aktiviteye sahip bileşenlerdir.

1.6.9. Morfogenezis

Kitinazlar, maya ve böcek morfogenezinde önemli rol oynar. Kitinaz ve kitosazın (kitosana etki eden enzim) fonksiyonel ekspresyonu ve *Saccharomyces pombe*'nin morfogenezi üzerindeki etkileri incelenmiştir. *ChiA* geni *S. pombe*'de ifade edildiğinde, maya hücrelerinin yavaş büyüdüğü ve hücrelerin uzadığı gözlemlenmiştir. Fakat *kitosanaA* geni ifade edildiğinde hücreler şişmiştir (Shimono vd.,2002).

1.6.10. Alerjik İnflamasyon

Her ne kadar memeliler kitin sentezleyemez veya metabolize edemese de kitotriosidazlar, asidik memeli kitinaz (AMCase), kitin bağlayıcı proteinler veya kitinaz benzeri proteinler (CLP'ler) gibi bazı kitinolitik enzimler memelilerde keşfedilmiştir (Lee, 2009). Bu nedenle, insanlarda kitositozidazın, farede AMCase'in oluşturduğu alerjik cevap ile aynı immünolojik aktiviteye sahip olup olmadığı, daha sonraki çalışmalarda araştırılması gereken ilginç bir sorundur.

1.7. Bakülovirüsler'in Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak Kullanılması

Bakülovirüsler, 25x250 nm büyüklükte ve 80-180 kbp kapalı yuvarlak ve çift zincir, süpersarmal DNA ihtiva ederler (Hayakawa vd., 2000, Herniou vd., 2001, Theilmann vd., 2005). Hücre zarı yapısına benzer ve karmaşık yapıda olan bir zarf ile çevrilen virüsün DNA'sı nükleokapsid içerisine paketlenmiştir. Bakülovirüs familyası, morfolojik, serolojik ve genetik bilgilere dayanılarak nüklear polihedrosis (NPV) virüs ve granulosis virüs (GV) olmak üzere iki alt cinse ayrılır.

Bakülovirüslerin genomları prokaryotik ve ökaryotik organizmalardan daha küçüktür. Ancak gen yapısı ve düzeyleri bakımından bu organizmaların genomlarına kısmen benzerlik gösterdiklerinden, moleküler biyoloji ve rekombinant DNA çalışmaları için iyi bir model oluşturmaktadırlar (Bilimoria,1991). Ayrıca, bu virüsler kullanılarak geliştirilmiş olan Bakülovirüs ekspresyon vektör sistemi (BEVS)'nde, tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli prokaryotik, ökaryotik, viral ve fungal genlerin ifadeleri mümkün olduğu için, biyoteknolojide büyük bir öneme sahiptirler (Volkman,1995). Diğer taraftan bu virüsler, zirai mücadelede zararlı böceklere karşı biyolojik kontrol ajanı olarak da kullanılmaktadırlar.

Bakülovirüs kitinazlarının enfekte konakçı larvalarının nihai sıvılaşmasından sorumlu olduğu bilinmektedir (Hawtin vd., 1997). Kitinazlar böcek kontrolü için yeni bir

araç olarak kullanılmaktadır. Bakülovirüslerin tip türü olan *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcNPV) Kitinaz A proteini, enfekte konakçı böceklerin nihai sıvılaşmasını teşvik eder. Bu enzimin hem endo hem de ekzo-kitinolitik aktiviteleri vardır ve 4 ila 10 arasında değişen bir pH aralığında aktiftir (Hawtin vd., 1997). Yapılan bir çalışmada kitinaz enzimi, *Escherichia coli* hücrelerinde rekombinant bir protein olarak üretilmiş ve *Bombyx mori* larvalarından izole edilen peritrofik matris üzerinde in vitro olarak test edilmiştir. Peritrofik matris geçirgenliğini doza bağlı bir şekilde arttırmış ve yapısal organizasyon değişmiştir. Sonuç olarak, rekombinant enzimi içeren bir diyetin *B. mori* larvalarına uygulanması larva mortalitesinde hızlı ve doza bağlı bir artışa neden olmuştur (Rao vd., 2004). Aynı araştırma grubu ayrıca AcNPV Kitinaz A'yı ifade eden transgenik tütün bitkileri üretmiş ve ilk kez bir kitinaz geninin bitkideki ifadesinin, hedeflenmemiş böcekleri etkilemeden otçul zararlılara ve mantar patojenlerine karşı direnci arttırdığını göstermiştir (Corrado vd., 2008). Sonuç olarak Kitinaz A, hemosel reseptörlerini hedefleyen biyoinsektisitlerin toksisitesini arttırmak için oral uygulama stratejilerinde bağırsak geçirgenliği artırıcı olarak etkili bir şekilde kullanılabilir.

Bu virüslerin geniş çapta kullanımlarını sınırlayan sebeplerden biri, fonksiyonlarını yavaş olarak yerine getirmeleridir. Öldürme süresini azaltmak için çeşitli genetik mühendisliği yöntemlerinin uygulanmasıyla, bakülovirüs enfeksiyonunun kısa süre içerisinde meydana gelebilmesi, insektisidal etkilerinin geliştirilmesi sağlanabilmektedir. Diğer bir önemli sebep ise Bakülovirüslerin konakçı spektrumlarının dar olması, bunların kullanımını ekonomik açıdan önemli ölçüde etkilemektedir. Maliyetinin düşürülmesi adına aynı virüsün birden fazla zararlı böcek üzerinde kullanılması arzu edilmektedir. Virüsün konakçı spektrumunun genişletilmesi, rekombinant tekniklerin kullanılmasıyla mümkün olmaktadır. Bu nedenle, bakülovirüslerin çeşitli konakçılar arasındaki seçiciliğini belirleyen moleküler mekanizmaların tespit edilmesi gerekmektedir.

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

Gram-negatif enterobacterium olan *Serratia marcescens* birkaç kitinolitik enzim üretir (Fuchs vd., 1986) ve kitinin biyolojik olarak parçalanmasında en etkili bakterilerden biridir (Monreal ve Reese, 1969). Bakteriyel kitinazlar böceklerle karşı potansiyel biyopestisitler olarak önerilmiştir (Bahar vd., 2012). *S. marcescens* potansiyel böcek patojeni olarak kullanılmaktadır. Alkalin pH'da aktif en az iki kitinaz içeren *S. marcescens* suşu kültür sıvısı, besine eklendiğinde *Spodoptera litura* larvalarında yüksek mortaliteye neden olmuştur (Aggarwal vd., 2015). *S. marcescens* WW4'ten elde edilmiş üç kitinaz (ChiA, ChiB ve ChiC) *Malacosoma neustria* ve *H. armigera* larvaları üzerinde böcek önemli seviyede insektisidal aktivite göstermiştir (Danışmazoğlu vd., 2015).

Bakteriyel kitinazlar, diğer insektisidal moleküllerle veya oral sindirim yoluyla alınabilen aktif böcek patojenleri ile kombinasyonlar halinde de kullanılmaktadırlar. Bu durum enzimin orta bağırsak epitelyumuna nüfuz etmesini kolaylaştırmaktadır. 1990'ların başında, Regev vd., (1996), *B. thuringiensis* δ -endotoksin kristal proteini (Cry1C) ile rekombinant endokitinaz (ChiAII)'ı birleştirerek *Spodoptera littoralis* larvaları üzerinde oral olarak test etmişler. Cry1C'nin *S. littoralis* larvaları üzerindeki insektisidal etkisinin, *S. marcescens* ChiAII nedeni ile arttığını gözlemlemişler. Cry1C'nin birlikte uygulanması ve artan ChiAII konsantrasyonları larva ağırlığında sinerjistik bir azalmaya (%62,0 ila 98,2) neden olurken, Cry1C tek başına larva ağırlığında sadece %37 azalmaya neden olmuştur. Bir başka çalışmada ise *B. thuringiensis* suşlarının böcek öldürücü aktivitesini geliştirmek amacıyla ile *S. marcescens* Xdl izolatına ait chiB ve chiC genleri *B. thuringiensis* suşlarına klonlanmıştır (Ozgen vd., 2013). *Galleria mellonella* larvaları ve *Drosophila melanogaster* yetişkinleri üzerinde test edilen rekombinant bakterilerin böcek öldürücü aktivitesi, ebeveyn *B. thuringiensis* ve *S. marcescens* suşlarından en az %50 daha fazla tespit edilmiştir.

1.9. Invertebrate Iridescent Virus 6 (IIV6)

Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6) Iridoviridae familyasına ait, Iridovirus cinsinin tip üyesi bir böcek virüsüdür (Williams vd., 2005). Genomu 212.482 baz çiftinden oluşan doğrusal, çift zincirli DNA'dan oluşmuştur (Jakob vd., 2001). IIV6, çeşitli zararlı böcekler üzerinde insektisidal aktiviteye sahip olduğu için ekolojik ve ekonomik öneme sahiptir (Jakob ve Darai, 2002). Bu nedenle IIV6, biyolojik kontrol için potansiyel bir ajan olarak düşünülebilir (Jakob vd., 2002).

Böceklerin doğada iridovirüsler ile enfeksiyonu, kanibalizm, parazit arılar veya nematodlar vasıtası ile meydana gelir (Hunter vd., 2001). IIV6 da olduğu gibi diğer omurgasız iridovirüslerinde de oral yoldan enfeksiyon çok düşük olasılık ile gerçekleşir (Williams vd., 2006). Bu özellik, IIV6'nın biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmasını sınırlamaktadır. Bununla birlikte, Entegre Zararlı Yönetimi (IPM) ile IIV6'nın diğer ajanlar ile birlikte kullanımı veya genetik mühendisliği yöntemleri ile modifiye edilerek biyokontrol ajanı olma potansiyelinin artırılması hedeflenmektedir.

1.10. Entegre Zararlı Yönetimi

Kimyasal pestisitlerin zararlarından kurtulmak amacı ile mahsulün korunması için uygulanabilecek sentetik kimyasalların miktarının giderek azaltılmasına paralel olarak, entegre zararlı yönetimi (IPM) programları geliştirilmektedir.

Entegre Zararlı yönetimi (IPM) kavramı, ilk olarak II. Dünya Savaşı'ndan sonra, ABD'deki pamuk zararlıları ile mücadelede kullanılan pestisitlerin fazla tüketiminin kontrol altına alınması fikrinin oluşması ile gündeme geldi. Biyolojik ve azaltılmış kimyasal kontrol taktiklerinin bir karışımı olan uyumlu bir kontrol stratejisi kullanmak gerekiyordu. IPM, 1972'de ABD başkanı Jimmy Carter tarafından ulusal politika olarak formüle edildi (Ehler ve Bottrell, 2000).

IPM tüm zararlı sınıflarının (böcekler, patojenler, yabancı otlar, omurgalılar) ekolojik

ve ekonomik açıdan sağlıklı bir şekilde kontrolünün optimize edilmesi için birçok taktiğin koordineli kullanımını içeren karar tabanlı bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Prokopy, 2003). “Entegre” kavramı “biyolojik ve kimyasal kontrolü birleştiren uygulamalı zararlı kontrolü” olarak tanımlanır (Stern vd.,1959). Bu program çiftçilerin tanınmış, biyolojik temelli ve önleme odaklı belirli IPM uygulamalarını kullanmalarını gerektirir (Benbrook, 2000).

1.11. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada viral ve bakteriyel kaynaklı kitinaz enzimlerinin insektisidal aktivite bakımından farklılıklarını ve kitinaz enziminin viral infektiviteye etkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaç doğrultusunda, biyolojik mücadele çalışılmalarında kullanılan bakülovirüslerden *Autographa californica nucleopolyhedrovirus (AcNPV)* ve *Cydia pomonella granulovirus (CpGV)* kitinaz enzimleri ile *Serratia marcescens* kitinaz enzimini kodlayan genler in-vitro ortamda ifade edildiler. Elde edilen proteinlerin insektisidal etkileri test böceği *Galleria mellonella* üzerinde test edildi ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Test edilen kitinazlardan bir tanesi Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6) ile birlikte *G. mellonella* üzerinde denendi.

Sonuçlar uygulanan viral kitinazlardan CpGV'nin kitinazının *G. mellonella* üzerinde daha etkili olduğunu bunu bakteriyel kitinazın takip ettiğini göstermiştir. Ayrıca kullanılan *S. marcescens* kitinaz enziminin, oral infektivitesi düşük olan IIV6'nın infektivitesini arttırdığı belirlendi. Bu çalışma ile birlikte bakteriyel ve viral kitinazların test böceği üzerindeki etkileri küçük çaplı şekilde ortaya konulmuş ve kitinaz enziminin viral infektiviteyi arttırdığı belirlenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Virüsler

Tezde, viral kaynaklı 2 adet ve bakteriyel kaynaklı 1 adet kitinaz geni çalışılmıştır. Viral kaynaklı kitinaz genleri *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcNPV) ve *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV)'ten temin edilmiştir. Bakteriyel kaynaklı kitinaz geni (Kitinaz C) ise *Helicoverpa armigera*'dan izole edilmiş *Serretia marcescens* bakterisine aittir. Bakteriyel kitinaz geni halihazırda pET28a ekspresyon vektörüne klonlanmış olarak temin edildi (Danismazoglu vd., 2015). Viral kitinaz genleri ise, AcNPV ve CpGV genomlarından PCR ile elde edilerek pET28a ekspresyon vektörüne klonlandı.

Tezde ayrıca Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6), oral infektivitesinde ki değişimin araştırılması amacı ile kitinaz proteini (*S. marcescens* Kitinaz C) ile birlikte kullanılmıştır. IIV6, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji laboratuvarından temin edilmiştir.

2.2. Viral DNA İzolasyonu

Viral kitinaz genlerini elde edebilmek için viral genomların elde edilmesi gerekmektedir. Bunun için KTÜ Mikrobiyoloji Laboratuvarı stoklarından AcNPV ve CpGV ler temin edildi. AcNPV'ü hücre kültüründe enfeksiyon için kullanılan stoktan ve CpGV'ü ise laboratuvarımızda bulunan bu virüse ait hazır sulu preperat (MADEX)'tan elde edildi.

Virüs süspansiyonlarından DNA izolasyon kiti (Qiagen) kullanılarak DNA'lar izole edildi (Şekil 4).Öncelikle her iki virüs süspansiyonundan 1000'er µl oda sıcaklığında 13,000 × rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Sıvı kısımları döküldü. Çöktellerin üzerine polihedrin proteininin çözülmesi için 25 µl 0,1 M NaOH (pH: 12.5) eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra pH'n nötrlenmesi için 15 µl

0,2 M Tris-HCl (pH:8) eklendi. Polihedrin proteini çözülen virionların üzerine kitte ki protokole göre: 180 µl ATL tamponu ve 20 µg/µl proteinaz K'dan 20 µl eklendi, 55°C'de 2 saat bekletildi. Üzerine 200 µl AL tamponu eklenerek, 15 saniye vortekslendi. Ardından 70°C'de 10 dakika bekletildi ve üzerine 200 µl %96'lık etanol eklenerek alt üst edildi. Karışım kite ait filtrelere boşaltılarak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve aşaya inen kısımlar atıldı. Kolonun üzerine 500 µl AW1 tamponu eklenerek, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek filtreye bağlanan DNA'lar yıkandı. Ardından, 500 µl AW2 tamponu eklenerek, 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapılarak yıkama işlemi tekrarlandı. Filtre yeni bir ependorf tüpe alınarak 200 µl AE tamponu eklenip, 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. DNA'ların miktarı ve saflığı nanodropta ölçüldü ve DNA'ların varlığı %0,7'lik agaroz jelde 80 V'da 30 dakika yürütülerek, ultraviyole ışık altında görüntülendi.



Şekil 4. Viral DNA izolasyon basamakları

2.3. Primerlerin Tasarlanması

Primer tasarlamak için gen bankasından, ACNPV ve CpGV'e ait kitinaz genlerini kodlayan nükleotid sıraları temin edildi. Genlerin başlangıç ve bitiş kısımlarına uygun primerler dizayn edildi (Tablo 1). Primerlerin uçlarına klonlamalarda kullanmak amacıyla restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri eklendi.

Tablo 1. AcNPV ve CpGV nin kitinaz genlerine ait primer dizileri

Primer adı	Sıra (5'-3')	5' uca eklenen enzim bölgesi
AcNPV-kit-Fw	GGGGATCCATTCCCGGCACGC	Bam HI
AcNPV-kit-Rv	GGCTCGAGTTACAGTTCATCTTTAGGT	Xho I
CpGV-Kit-Fw	GGGGATCCAAACCCGGCACACC	Bam HI
CpGV-Kit-Rv	GGCTCGAGTCATACTGAATTGCACAC	Xho I

2.4. Kitinaz Genlerinin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması

Kitinaz genleri (AcNPV-kit, CpGV-kit) yukarıda hazırladığımız primerleri kullanarak viral DNA'lardan PCR aracılığı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonu için tüpe; 0.25 µl Go Taq DNA polimeraz, 10 µl Go Taq buffer (5X), 5 µl 2,5 mM MgCl₂, 1 µl 1mM ileri primeri, 1 µl 1 mM geri primeri, 1 µl 10 mM dNTP'den ve 2 µl viral DNA bırakılarak reaksiyon hacmi steril dH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. PCR şartları ise 98 °C'de 3 dakikalık denatürasyondan sonra 30 döngü olacak şekilde 98 °C'de 50 saniye, 55 °C'de 50 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve son olarak da 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntüledi.

2.5. Kitinaz Genlerinin pJET1.2 Vektörüne Klonlanmaları

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan kitinaz genleri agaroz jelden kesildikten sonra Nucleospin Extract DNA Purification (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendi. Temizlenen DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu nanodropla tespit edildi. DNA fragmentlerinin, pJET1.2 vektör ile (Promega) 3 DNA fragmenti 1 vektör oranında ligasyon reaksiyonları hazırlandı. Reaksiyon 1µl pJET1.2 vektörü, 7,5 µl 2x ligasyon

tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz ve 5,5 µl DNA fragmenti bir araya getirilerek 15 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi. Reaksiyon 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2.6. Kompetent *E. coli* DH10β Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon

Transformasyon'da kullanılmak üzere öncelikle alıcı *Escherichia coli* DH10β hücreleri CaCl₂ metoduna göre kompetent hale getirildi. Bunun için petride bulunan *E. coli* DH10β hücrelerinden tek bir koloni alınıp NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37°C'de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden fazla miktarda ki LB Broth besiyerine 1:10 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37°C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,4-0,6 olacak şekilde yaklaşık 1 saat büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4°C'de 4000 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti 100 mM'lık 10 ml soğuk CaCl₂'de hafifçe sallanarak çözüldü ve 30 dakika buzda bekletildi. Ardından 5.000×rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı döküldü ve çökeltide ki hücreler 100 mM'lık 2 ml soğuk CaCl₂'de çözüldü. Bu şekilde transformasyona hazır hale gelmiş, kompetent hücreler 4 °C'de 2 saat bekletilip kullanıldı.

Yukarıdaki işleme göre hazırlanan kompetent *E. coli* DH10β hücrelerinden 200 µl alınarak 15 µl ligasyon ürününün üzerine eklendi. Karışım 30 dakika buzda bekletildikten sonra, 45°C'de 2 dakika ısıtıldı ve ardından tekrar 2 dakika buzda bekletildi. Kompetent hücre ve ligasyon karışımını içeren tüp içeriği 1 ml LB besiyeri içeren steril cam tüplere aktararak, 37°C'de 250 rpm'de 60-90 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra büyüyen hücreler mikrosantrifüj tüplerine aktararak 6000xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Ependorf tüpte 100 µl kalacak şekilde sıvı kısım döküldü ve kalan sıvı içinde hücreler çözüldü. Ampisilin (50 µg/ml) içeren LB agar petrilere hücreler yayma ekim ile inoküle edildi. Petriler gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan beyaz kolonilerin içerdikleri rekombinant plazmid DNA'larını izole etmek için 50 µg/ml ampisilin içeren sıvı LB besiyerlerinde gece kültürleri hazırlandı.

2.7. Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi

Plazmid DNA'larının izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 10.000xg'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki sıvı kısım geride 50 µl kalacak şekilde döküldü ve hücre çökeltisi vorteksenerek çözüldü. Çözülen hücrelerin üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 0.1 N NaOH, %0.5 SDS) ilave edildi ve tüpler 4-5 kez alt-üst edilerek karıştırıldıktan sonra 150 µl 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edilerek, tekrar 5-6 kez alt-üst edildi. Ardından buzda 10 dakika bekletildi ve 5 dakikada bir kez alt-üst edildi. Bu süre sonunda tüpler, 14.000xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Plazmit DNA'ları ihtiva eden sıvı kısım temiz tüplere alındı ve üzerlerine 900 µl %96'lük etanol ilave edilerek oda sıcaklığında karıştırıldı. Tüpler 14.000xg'de 3 dk. santrifüj yapıldı. Plazmit DNA'ları ihtiva eden çökelti %70'lik 500µl etanol ile karıştırıldı ve 14.000xg'de 2 dakika santrifüj yapılarak yıkandı. Oluşan çökelti 37°C'de 10 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 25 µl dH₂O'da çözüldü.

İzole edilen rekombinant plazmitlerin kitinaz DNA'larını içerip içermediğini tespit etmek için bu plazmitler BamHI ve XhoI restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Bunun için 7 µl DNA, 0.5 µl BamHI ve 0.5 µl XhoI, 3 µl 10X reaksiyon tamponu ve 19.5 µl RNaz'lı H₂O olacak şekilde 30µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda reaksiyonlar %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. İstenilen DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

Bu klonlardan plazmit izolasyon kiti (Machery Nagel) kullanılarak saf plazmit DNA'ları izole edildi. Bunun için 3 ml gece kültürleri 9.000xg'de 2 dakika santrifüj edildi ve sıvı kısımlar uzaklaştırıldı. Çökelti 250 µl süspansiyon tamponunda vorteksenerek çözüldü. Tüplerin üzerine 250 µl parçalama tamponu eklenip 4-5 kez alt-üst edildi ve bunlarında üzerine 10 µl alkalın proteaz ilave edilerek 4-5 kez alt üst edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra üzerlerine 350 µl nötralizasyon solüsyonu ilave edildi. Tekrar oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 10 dakika 13.000 rpm'de

santrifüj edildi. Çökelti uzaklaştırılarak, sıvı kısım, kitte bulunan ve içlerinde filtre ihtiva eden kolonlar ile süzüldü. Süzme işleminin ardından kolonlar iki kez yıkama tamponu ile santrifüj edilerek yıkandı. Kolonlar temiz mikrosantrifüj tüplerine geçirildi. DNA'nın kolonlardan ayrılarak mikrosantrifüj tüplerinde toplanması için kolonların üzerlerine 50 µl dH₂O ilave edildi ve 13.000xg'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Plazmit DNA konsantrasyonları nanodropta belirlendi.

2.8. Kitinaz Genlerinin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanmaları

pET-28a(+) ekspresyon vektörü DNA'sını fazla miktarda elde etmek için bu vektörden 0.1 µl kompetent hücrelere transform edildi. Hücreler 50 µg/ml kanamisin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyu (14-16 saat) büyütüldü. Gece kültürü 14.000 rpm'de 2 dakika çöktürüldü. Hücrelerden plazmit DNA izolasyonu, "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega, USA) kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

İzole edilen plazmit DNA'sı XhoI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesildi. Reaksiyon 10 µl plazmit DNA, 3 µl 10X TA tamponu, 1 µl XhoI, 1 µl BamHI ve 15 µl steril dH₂O bir araya getirilerek son hacim 30 µl olacak şekilde hazırlandı ve 37 °C'de 3 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen ürün %1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Restriksiyon endonükleazlarla lineer hale gelmiş ve 5369 bp büyüklüğündeki pET-28a(+) vektörü, DNA temizleme kiti kullanılarak jelden temizlendi.

Kitinaz genleri buldukları rekombinant pJET1.2 vektörlerinden restriksiyon enzimleri ile kesilerek çıkartıldı. Bunun için tüplere rekombinant pJET1.2 DNA'larından 8'er µl alınarak, 3'er µl 10X TA tamponu, 1'er µl XhoI ve BamHI restriksiyon enzimleri ve 17 µl steril dH₂O bir araya getirilerek toplam 30 µl hacimde reaksiyonlar hazırlandı ve tüpler 37 °C'de 3 saat boyunca inkübe edildi. Kesim ürünleri DNA standardı olarak 1kb DNA Ladder (Promega) ile birlikte %1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. pJET1.2 vektöründen XhoI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesilerek ayrılan kitinaz genleri,

agaroz jelden kesilip alındılar ve DNA temizleme kiti kullanılarak temizlendiler.

Jelden temizlenen kitinaz genleri ve pET-28a(+) vektörü ile 3 vektör ve 1 DNA olacak şekilde ligasyon reaksiyonu oluşturuldu. Buna göre her bir gen için reaksiyon; 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu (Promega), 1 µl T4 DNA ligaz enzimi (Promega), 2 µl pET-28a(+) vektörü, 6 µl insert DNA ve 9 µl ddH₂O olacak şekilde hazırlandı ve ligasyon reaksiyonu +4 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Ligasyon reaksiyonları kompetent *E. coli* DH10β hücrelerine transform edildi. Transformasyon neticesinde oluşan kolonilerden plazmit DNA izolasyonu yapıldı ve bu plazmitler kitinaz genlerinin varlığını doğrulamak için restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edildiler.

2.9. Kitinaz Genlerini İçeren pET28a Vektörlerinin *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerine Transformasyonları

Protein ekspresyonu işlemi için *E. coli* BL21(DE3) hücreleri kullanılmıştır. Öncelikle bu hücreler kompetent hale getirildiler. Bunun için *E. coli* BL21(DE3) hücresine ait bir koloni 3 ml LB besiyerine aşılandı ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyunca inkübe edildi. Kompetent oluşturmak için yine CaCl₂'lü metot kullanıldı. Kitinaz genlerini içeren rekombinant pET28a vektörleri hazırlanan kompetent hücrelere transformasyon yapıldı. Bunun için rekombinant plazmit DNA'sından 3 µl alındı ve 200 µl hücre ile karıştırıldı. Karışım 30 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 2 dakika 45 °C'de bekletildi. Daha sonra reaksiyon karışımı, içerisinde 1 ml LB besiyeri olan cam tüpe boşaltıldı ve 37 °C'de 200 rpm'de 1 saat sallandı. Bu süre sonunda ependorf tüplere alınan kültür 6000×g'de 3 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı çökelti halindeki hücrelerin üzerinde 100 µl besiyeri kalacak şekilde döküldü ve hücreler kalan sıvı içinde çözüldü. Daha sonra 50 µg/ml kanamisin içeren LB agar petrilere yayma ekimi yapıldı ve gece boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Aynı yöntemle, gen klonlanmamış pET-28a(+) vektörünün kendisi de *E. coli* BL21(DE3) hücresine aktarıldı. Klonlama işlemlerinin olup olmadığından emin olmak için plazmit izolasyonu ve ardından restriksiyon enzimleri ile tekrar kesim yapılarak doğrulamalar yapıldı.

2.10. Kitinaz Proteinlerinin ifade Edilmesi

Kitinaz proteinlerinin ifadesini görmek için kitinaz genlerinin klonlandığı pET28a(+) vektörlerini içeren *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden kanamisinli LB sıvı besiyerine inokülasyonlar yapıldı. İnokülasyonlar, 16 saat 37 °C'de 200 rpm'de inkübe edildi. Kültürlerin OD leri spektrofotometrede ölçüldü ve geniş hacimli kanamisinli LB sıvı besiyerine, OD₆₀₀'de 0,1 olacak yoğunlukta aşılındılar. Aşılanan örnekler 37°C'de 225 × rpm hızında sallayıcıya inkübe edildi. Büyüme aralığı 0,6-0,8 olana kadar aralıklarla kontrol ölçümleri yapıldı. İstenen konsantrasyona gelen örneklerle son konsantrasyon 1mM olacak şekilde IPTG (izopropil-trigalaktosidaz) eklenerek protein üretimi için *E. coli* BL21(DE3) hücresi içindeki plazmitler indüklendi. IPTG örneklere eklendikten sonra 30°C'de 4-6 saat sallayıcıda sallandılar. İnkübasyon sonunda hücreler 5000×rpm de 4 °C de 6 dakika santrifüj edildiler. Oluşan çökelti 1ml PBS-Protease karışımı ile çözüldü ve 5000×rpm de 4 °C de 6 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Çökelti, protein saflaştırılması için kullanıldı.

2.11. Proteinlerin Saflaştırılması ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

pET-28a(+) vektöründe ifade olan kitinaz proteinleri N-terminallerinde histidin kuyruk ile birlikte ifade edildiler. Proteinlerin bu özelliğinden faydalanıldı ve protein saflaştırma için MagneHis™ Protein Purification System (Promega) kiti kullanıldı. Saflaştırma işlemi kit içinde bulunan prosedür kullanıldı. OD₆₀₀ de ölçülen her bir bakteriyel yoğunluk için 100µl of 1X parçalama tamponu kullanılarak prosedür takip edildi.

Protein konsantrasyonu Bradford (1976) metodu ile belirlendi. Öncelikle bovine serum albumin (BSA) kullanılarak standart eğrisi hazırlandı. Bunun için farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg) BSA çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden ve konsantrasyonunu belirleyeceğimiz kitinaz proteinlerinden

10'ar µl alındı 200'er µl boya çözeltisi ile (Protein Reagent, Sigma) karıştırıldı. Bu karışımlar 96 kuyulu tabağın kuyucuklarına 3 tekrarlı şekilde bırakıldı. 15 dakikalık inkübasyonun ardından SpectraMax M2 (Molecular Devices) cihazı ile 595 nm'de ölçümleri yapıldı.

2.12. Kitinaz Proteinlerinin Analizi

Proteinlerin analizi için önce SDS-PAGE (Sodyum Dedosil Sülfat-Poliakriamid Jel Elektroforez) ve ardından Western Blot yapıldı. SDS-PAGE analizi için birbirinin aynısı iki ayrı jel hazırlandı. Jellerden bir tanesi saflaştırılan proteinlerin büyüklüklerini görmek amacıyla SDS-PAGE'in ardından Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyandı. Elektroforezi yapılan diğer jel ise saflaştırılan proteinin antikor ile gösterimi için western blot hibridizasyonunda kullanıldı.

2.12.1. SDS-PAGE Analizi

Bu analiz için amacımıza uygun olan kalınlıktaki (1 mm) cam plakları birbirleriyle birleştirilerek elektroforez aparatı hazır hale getirildi. Bir jel için ayırma ve yürütme jeli şeklinde iki ayrı jel hazırlandı. Ayırma jeli için; 1,6 ml H₂O, 2 ml %30'luk akrilamid, 1,3 ml 1,5 M Tris (Ph:8.8), 0,05 ml %10'luk SDS, 0,05 ml %10'luk Amonyum sülfat ve 0,002 ml TEMED birleştirilerek karıştırıldı. Bir araya getirilmiş cam levhalar arasına solüsyon pipetle hızlıca aktarıldı. Donması ve boşluk kalmaması için üzerine bir miktar su eklendi. 15 dakika donmaya bırakıldı. Bu arada yürütme jeli hazırlandı. Bunun içinde; 1,4 ml H₂O, 0,33 ml %30'luk akrilamid, 0,25 ml 1,5M Tris (pH:6,8), 0,02 ml %10'luk Amonyum persülfat, 0,02 ml %10 SDS ve 0,002 ml TEMED birleştirilerek karıştırıldı. Ayırma jeli üzerindeki su boşaltıldı. Üzerine hazırladığımız yürütme jeli eklenip, tarak yerleştirildi ve donmaya bırakıldı. Donduktan sonra tarak çıkarıldı ve jel elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın içine max seviyede 1X SDS koşturma tamponu eklendi.

Bu arada örnekler hazırlandı. -20 °C' de bekleyen örnekler çıkarılıp 100 µl PBS ile çözüldü. Ardından 100 µl parçalama tamponu eklenip karıştırıldı ve 20 dakika buzda bekletildi. Bu örneklerden 20µl alınıp 20µl 6X örnek tamponu ile iyice karıştırıldı ve 100 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Ardından en yüksek hızda 1 dakika santrifüj edildi ve tekrar buza alındı. Örnekler hazırlanan jele yüklendi. En başa marker olarak PageRuler Prestained Protein Ladder 'dan (prestained) 6µl yüklendi. Diğer kuyulara 20'şer µl örneklerden yüklendi. Önce 15 dakika 80 V' ta, ardından 120 V' ta 1 saat civarında yürütüldü.

Saflaştırılan proteinler SDS-PAGE yapıldıktan sonra görüntülenmeleri için jelin boyanması gerçekleştirildi. Boyama için Coomassie Brilliant Blue boyası kullanıldı. Bu boyama işleminde ilk olarak SDS-PAGE yapılan jel 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml saf su karışımında 1 saat sallanarak bekletildi. Ardından jel Coomassie Brilliant Blue boya solüsyonu (%0.1 R250, %50 metanol, %10 asetik asit) içinde 30-45 dakika sallanarak bekletildi. Bu süre sonunda boya boşaltıldı ve jelin üzerine 40 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 50 ml saf su karışımı dökülerek 30-45 dakika sallayıcıda bekletildi. Bu süre sonuna doğru jel üzerinde ki bantlar görünmeye başladı.

2.12.2. Western-blot Analizi

Elektroforez yapılan diğer jel Western Blot analizi için kullanıldı. Bu işlem için; Whatman kağıdı iki eşit parçaya bölündü. Jelin boyutuna uygun nitroselüloz membran ayarlandı. Geniş bir cam petriye 20 ml metanol konularak membran ıslatıldı. Daha sonra üzerine elektroblotlama tamponundan 80 ml eklenerek whatman kağıdı ıslatıldı. Cam plakalar arasından çıkarılan jelde bu karışım içinde 1-2 dakika bekletildi. Elektroblotlama tamponu için 5,8 gr Tris, 2,9 gr Glisin, 0,375 gr SDS, 800 ml su karıştırıldı. Cihaza yerleştirirken sırayla alttan yukarı doğru whatman kağıdı, nitroselüloz membran, jel, whatman kağıdı sırasında kağıtlar ve jel yerleştirildiler. Her bir parça elektroblotlama tamponunda iyice ıslatılarak yerleştirildi. Daha sonra cihazın kapağı kapatıldı ve 40 mA'de

90 dakika blotlama işlemi yapıldı. Blotlama işlemi bittikten sonra membran cihazdan alındı ve 2,5 gr süt tozu içeren 50 ml PBS içinde +4 °C de 3 saat bekletildi. Takiben membran süt tozu ve tween 20 ihtiva eden solusyon içerisinde 3 kez 10 ar dakika yıkandı. Yıkama işleminin ardından membran histidin antikoru ihtiva eden PBS-süt tozu karışımı içerisinde 4 saat döndürülerek inkübe edildi.

Bu süre sonunda membran tekrar PBS-süt tozu karışımı ile yıkandı. Ardından anti-histidin alkalın fosfataz antikoru ihtiva eden PBS-süt tozu karışımı içerisinde 2 saat döndürülerek inkübe edildi. Sonra membran tekrar PBS-süt tozu karışımı ile üç kez yıkandı. Ardından AP tamponu (0,1 M Tris.HCL+0,1 M NaCl+5 Mm MgCl₂+6H₂O. pH:9,5) ile iki kez yıkandı. Yıkama işlemlerinin ardından membran 100 µl NBT (nitroblue tetrazolium) ve BCIP (bromochloroindolyl fosfat) (NBT/BCIP stock solution, Roche) içeren 10 ml AP tamponu içinde bekletildi. Membran üzerinde bantlar görülmeye başlayınca dH₂O ile yıkanarak reaksiyon sonlandırıldı.

2.13. Proteinlerin Diyalizi

Saflaştırılan proteinleri en son olarak çözülmüş oldukları tamponun içeriğinde ki kimyasallardan arındırmak için diyaliz işlemi yapıldı. Diyaliz işleminde öncelikle membran kaynatılarak hazırlandı. Kaynatma için 500 ml saf suya 10gr NaHCO₃ ve 1 ml 0.5M EDTA eklendi ve bu karışım kaynadıktan sonra içerisine membran bırakılarak 10 dakika membranın kaynaması beklendi. Ardından membran kaynayan saf su içerisine aktarıldı ve 10 dakika da burada kaynatıldı. Kaynatma işleminin ardından membran soğumaya bırakıldı. Soğuyan membranın alt kısmı kapatıldı ve içerisine proteinler bırakıldıktan sonra üst kısmıda kapatıldı. Protein ihtiva eden membranlar 1xPBS tamponu içerisinde 24 saat boyunca döndürüldüler. Bu süre zarfında PBS solusyonu üç defa değiştirildi. Diyaliz işleminin ardından membranlardan alınan proteinlerin konsantrasyonları spektrofotometre ile ölçüldü.

2.14. Proteinlerin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

AcNPV, CpGV ve *S. marcescens* kitinazların insektisidal etkilerinin belirlenmesi için bu proteinlerin beş farklı konsantrasyonda böceklere yedirilmesi planlandı. Uygulanacak konsantrasyonlar 1500 ng/μl, 1800 ng/μl, 2000 ng/μl, 2500 ng/μl, 3000 ng/μl olarak belirlendi. Proteinler belirlenen konsantrasyonlarda PBS içerisinde hazırlandı. Enfeksiyon için 3. instar *Galleria mellonella* larvaları kullanıldı. Larvalar enfeksiyondan önce 16 saat aç bırakıldı. Bu sürenin sonunda hazırlanan farklı konsantrasyonlarda ki kitinazlar besin ile birlikte larvalara ağızdan verildi. Kitinaz verilen larvalar tekli kaplarda muhafaza edildi. Kitinaz bulaştırılmış besinleri bitiren larvalara kitinazsız yeni besinler verildi. Bu larvalar, normal laboratuvar ortamında 14 gün bırakıldı ve her gün kontrol edilerek ölen larvalar sayıldı. Her konsantrasyon için 30 adet larva kullanıldı ve deneyler üç tekrar olarak yapıldı. Negatif kontrol olarak PBS kullanıldı.

İnsektisidal aktivite sonuçları Abbott formülü kullanılarak anlamlandırıldı (Abbott, 1925). Grupların LC₅₀ ve LT₅₀ değerleri GraphPad Prism yazılımında probit analizi kullanılarak değerlendirildi.

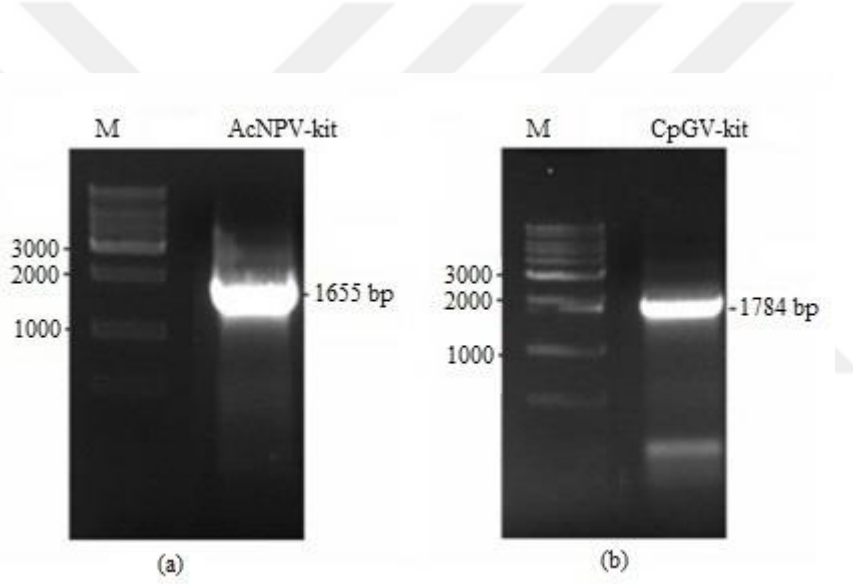
2.15. Kitinaz Proteini ve Virüs Karşınının İnsektisidal Etkisinin Test Edilmesi

Kitinaz proteini etkinliğini bir başka açıdan değerlendirmek ayrıca kitinazın IIV6'nın oral infektivitesine katkısının olup olmayacağını belirlemek amacıyla, kitinaz proteini ve IIV6'nın larvalar üzerinde ki insektisidal etkisi birlikte test edildi. Bu işlem için *S. marcescens* kitinazı kullanıldı. Kitinaz proteini yukarıda belirtilen beş farklı konsantrasyonda IIV6 ile birlikte test edildi. Deneyde öncelikle kitinaz proteinleri larvalara besinle birlikte yedirildi ve bu işlemi takip eden 24. saatte larvalara besin ile birlikte 20 μl IIV6 (4.7x10⁸ pfu/ml) yedirildi. Tek başına yedirilen virüs ve kitinaz proteinleri negatif kontroller olarak kullanıldı. Test sonuçlarına göre insektisidal aktivite grafiği oluşturuldu.

3. BULGULAR

3.1. Viral kitinaz Genlerinin PCR ile oğaltılması

AcNPV ve CpGV kitinaz genleri (AcNPV-kit, CpGV-kit) dizayn edilen uygun primerler ile PCR'da çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Beklenildiği şekilde AcNPV kitinaz geninin 1665 bp, CpGV kitinaz geninin ise 1784 bp büyüklüğünde bantlar oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 5).

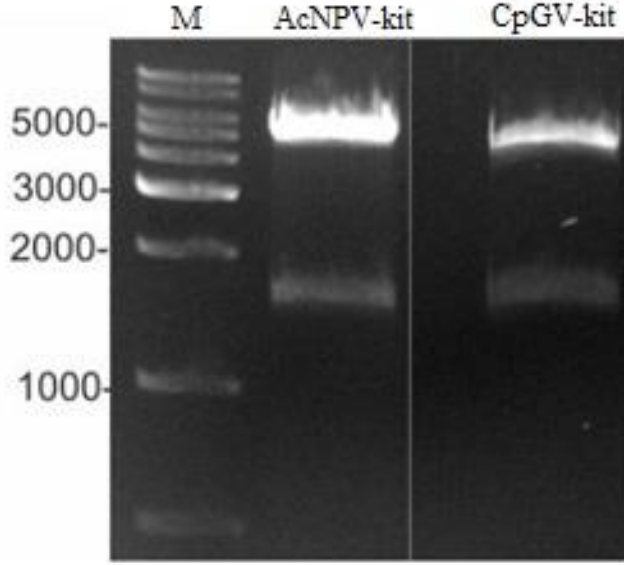


Şekil 5. PCR ile oğaltılmış AcNPV ve CpGV kitinaz genlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü M: 1 kb DNA marker (Promega), (a) AcNPV kitinaz geni, (b) CpGV kitinaz geni

3.2. Viral kitinaz Genlerinin Klonlanması

PCR ile çoğaltılan AcNPV ve CpGV kitinaz genleri öncelikle pJET1.2 transfer vektörüne ardından da pET-28a(+) ekspresyon vektörüne aktarıldı. Bunun için ayrı ayrı pJET1.2'ye klonlanmış AcNPV ve CpGV kitinaz genleri, BamHI ve XhoI restriksiyon enzimleri ile bu vektörlerden kesildi ve kitinaz DNA fragmentleri jelden temizlendi. Genler aynı enzimler ile kesilmiş ve hedef vektör olan pET-28a(+)

ekspresyon plazmidine yerleştirildi. Genlerin hedef vektöre klonlandığı plazmit izolasyonu ve plazmitlerin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ile doğrulandı (Şekil 6).



Şekil 6. AcNPV ve CpGV kitinaz genlerini taşıyan rekombinant pET28(+) plazmitler. M; Marker. Kitinaz genlerini taşıyan rekombinant pET28(+) plazmitleri BamHI ve XhoI enzimleri ile kesilmiştir. % 1'lik agaroz jelin üst kısmında lineer haldeki pET28(+) plazmidini ve alt kısmında ise AcNPV kitinaz geni için 1655bp ve CpGV kitinaz geni için de 1784bp büyüklüğünde fragmentler görülmektedir.

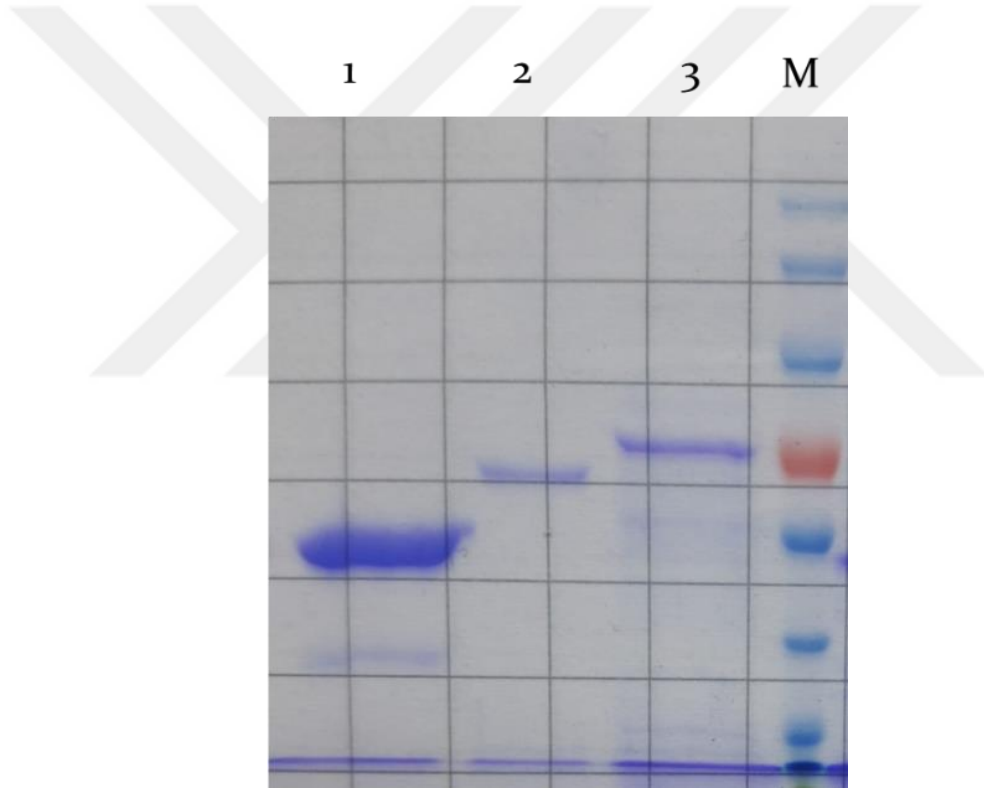
3.3. Protein Ekspresyonu ve Analizi

Protein ekspresyonu için viral kitinaz genlerinin klonlandığı pET-28a(+) vektörleri ve daha önceki çalışmalar sırasında klonlanmış *S. marcescens* kitinaz C genini içeren pET-28a(+) vektörü *E.coli* BL21(DE3) konak hücresine aktarıldılar. Bu konakta proteinlerin üretilmesi ve üretilen proteinlerin saflaştırılması sağlandı.

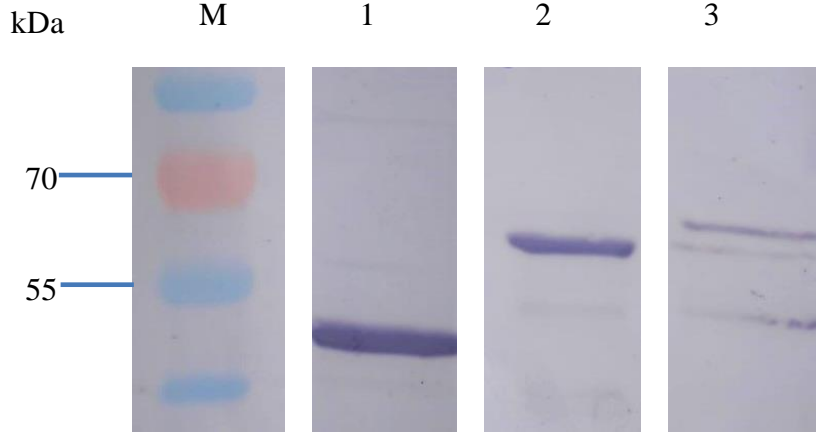
Saflaştırılan proteinler %10'luk SDS-PAGE ile analiz edildiler. Elektroforez işlemi birbirinin aynısı şeklinde örneklerin yüklendiği iki adet jel kullanılarak yapıldı. Jellerden bir tanesi Coomassie Brilliant Blue ile boyandı. Boyama yapılan jel üzerinde *S. marcescens*

kitinaz C geni, AcNPV kitinaz geni ve CPGV kitinaz geni için beklenen büyüklüklere (sırasıyla 50 kDa, 63 kDa, 68 kDa) uygun büyüklükte protein bantları gözlemlendi (Şekil 7).

Elektroforezi yapılan diğer jel ise western-blot analizi için kullanıldı. Western analizi, proteinlerin N-terminallerine ekspresyon vektörü aracılığı ile takılan histidin etiketine bağlanarak bu proteinleri görmemizi sağlayan histidin antikoru ile yapıldı. Bu analiz sonucunda da, membran üzerinde yine kitinaz proteinlerinin beklenen büyüklüklerine uygun büyüklükte bantlar gözlemlendi (Şekil 8).



Şekil 7. Saflaştırılmış *Serretia marcescens*, AcNPV ve CpGV kitinaz proteinlerinin Coomassie Brilliant Blue ile gösterilmesi. 1- *S. marcescens*-kit proteini (50 kDa), 2- AcNPV-kit (63 kDa), 3- CpGV-kit (68 kDa), M- marker (prestained).

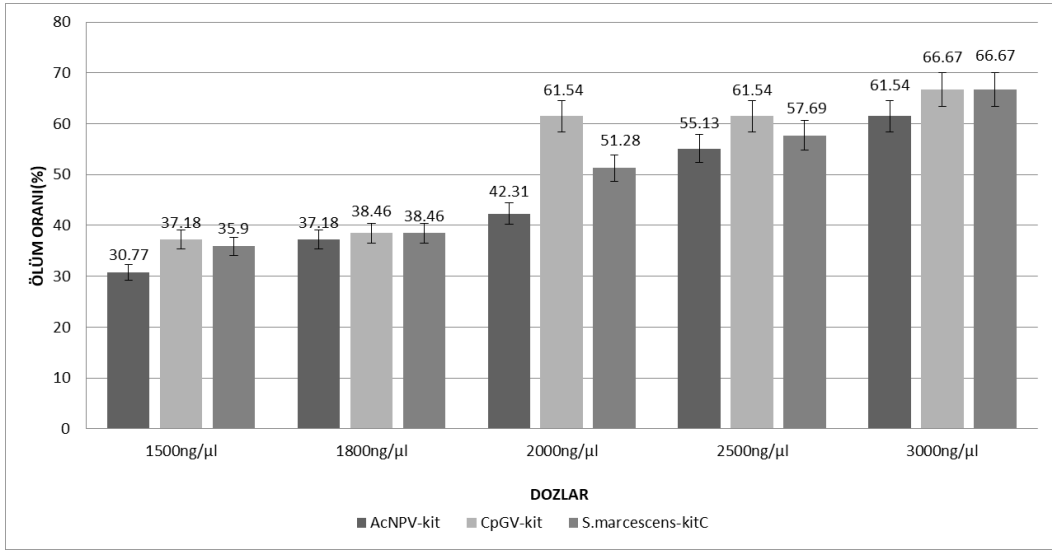


Şekil 8. *Serretia marcescens*, AcNPV ve CpGV kitinaz proteinlerinin western-analizi M; marker (prestained), . 1- *S. marcescens*-kit proteini (50 kDa), 2- AcNPV-kit (63 kDa), 3- CpGV-kit (68 kDa).

3.4. Kitinaz Proteinlerinin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada Lepidoptera grubuna ait olan *Galleria mellonella* böceğinin 3. instar larvaları test organizması olarak kullanıldı. Viral ve bakteriyel kitinazların larvalar üzerinde ki etkileri 14 gün boyunca gözlemlendi ve sonuçlar grafik oluşturularak karşılaştırıldı. Elde edilen veriler Abbott formülü kullanılarak anlamlandırıldı (Abbott, 1925).

İnsektisidal aktivite sonuçları *G. mellonella* larvaları üzerinde kullanılan viral ve bakteriyel kitinazların etkilerinin birbirinden çok farklı olmadıklarını gösterdi. Bununla birlikte CpGV ve *S. marcescens* kitinazlarının birbirlerine çok yakın ancak AcNPV kitinazından da az bir farkla daha yüksek etki oluşturdukları görülmektedir (Şekil 9).



Şekil 9. Saflaştırılmış AcNPV-kit, CpGV-kit ve *S. marcescens*-kitC proteinlerinin farklı konsantrasyonlarda, *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri.

3.5. İsektisidal Aktivite Sonuçlarının LC₅₀ Değerleri

İsektisidal aktivite sonuçları kullanılarak larvaların %50 sini öldürmek için gerekli protein konsantrasyonları (LC₅₀) hesaplandı (Tablo 2).

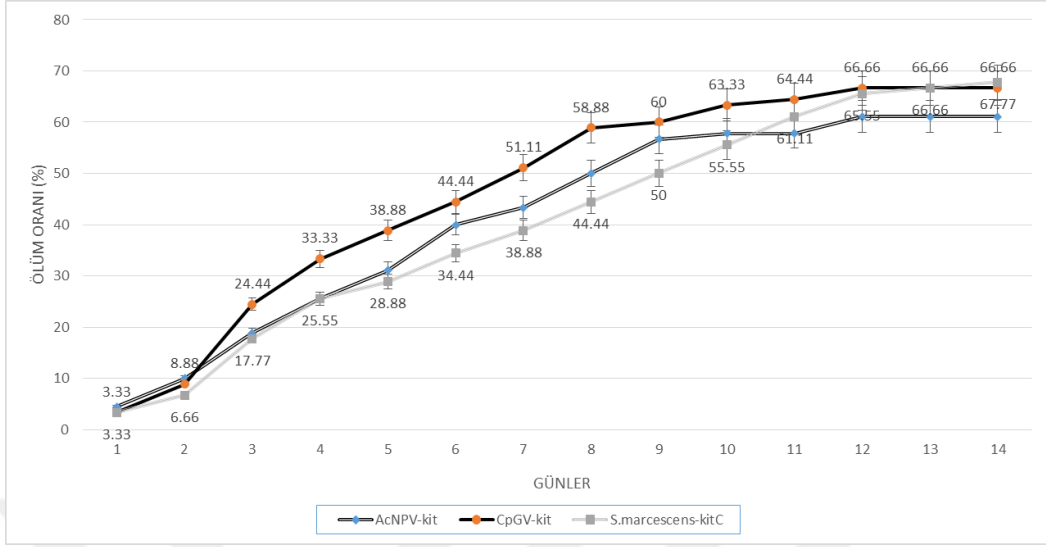
Tablo 2. AcNPV-kit , CpGV-kit ve *S. marcescens*-kit C proteinlerinin LC50 değerleri

Kitinaz	LC ₅₀	Slope±SE	df	X ²
AcNPV-Kit	2318,318 ng	2,753±0,066	3	0,997
CpGV-Kit	1958,961 ng	2,686±0,067	3	0,658
<i>S.marcescens</i> -KitC	2095,064 ng	2,734±0,066	3	0,944

3.6. İsektisidal Aktivite Sonuçlarının LT₅₀ Değerleri

İsektisidal aktivite deneylerinde her gün ölen böceklerin sayısı not edildi. Bu veriler kullanılarak zamana bağlı olarak ölü larva oranları belirlendi ve grafik oluşturuldu (Şekil 10). Ayrıca bu sonuçlar kullanılarak larvaların %50 sini öldürmek için gerekli zaman (LT₅₀)

hesaplandı (Tablo 3).



Şekil 10. Safaştırılmış AcNPV-kit, SpGV-kit ve *S. marcescens*-kitC proteinlerinin zamana bağlı olarak *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki ölüm oranları

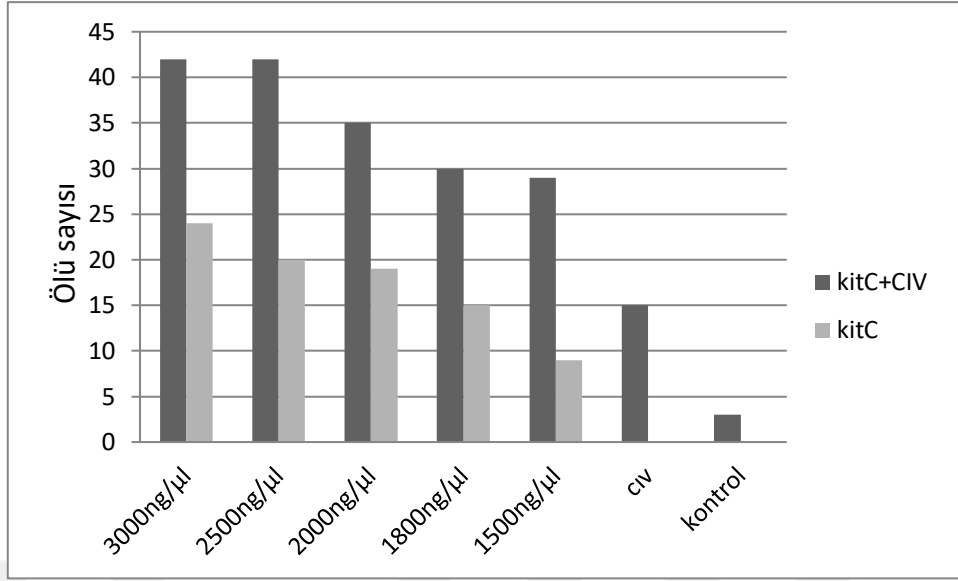
Tablo 3. AcNPV-kit, SpGV-kit ve *S. marcescens*-kit C proteinlerinin LT50 değerleri

Kitinaz	LT ₅₀ (Gün)	Slope±SE
AcNPV-Kit	8,600 (6,55-11,28)	1,882±0,060
CpGV-Kit	7,199 (5,62-9,20)	2,086±0,055
<i>S.marcescens</i> -KitC	8,639 (6,76-11,04)	2,110±0,054

3.7. Kitinaz ve Virüs Karşımınım İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Elde ettiğimiz bilgilerin ışığı altında *G. mellonella* larvaları üzerinde nispeten güçlü insektisidal etkiye sahip olan *S. marcescens* kitinaz C proteini, Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6) ile birlikte larvalar üzerinde test yapıldı.

Elde edilen sonuçlar *S. marcescens* kitinaz C proteininin virüs ile birlikte uygulandığında daha etkili sonuç oluşturduğunu ve IIV6'nın ağız yolu ile enfeksiyonunu arttırdığını göstermiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Saflaştırılmış *S. marcescens*-kitC proteini ve IIV6'nin *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi

4. TARTIŞMA

Son yıllarda kimyasal pestisit kullanımının artması ve bu kimyasalların ekosistem üzerindeki etkileri tüm canlıları olumsuz etkilemektedir. Bu olumsuz etkiler nedeniyle, kimyasal pestisitlere alternatif, doğaya ve canlılara karşı daha masum ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bilim adamları bu konular üzerinde yoğun araştırmalar yapmaktadırlar. Özellikle biyopestisit geliştirilmesine yönelik bilimsel araştırmaların sayısı gün geçtikçe artış göstermektedir. Biyopestisitler, mikrobiyal biyopestisitler, bitki pestisitleri ve biyokimyasal pestisitler şeklinde sınıflandırılmaktadır (Yarsan ve Çevik, 2007). Mikrobiyal biyopestisitler virüs, bakteri, fungus protozoa veya nematot gibi canlı mikroorganizmaların kendilerini veya bu mikroorganizmaların ürünlerini içerebilmektedir. Mikroorganizma ürünleri arasında başta *Bacillus thuringiensis* kristal (cry) δ -endotoksin proteinleri olmak üzere, yine Bt'ye ait vejetatif insektisidal proteinler (vip) ve sitolitik proteinler (cyt), bakteriyal, viral veya fungal kaynaklı kitinaz proteinleri ve çeşitli proteazlar bulunmaktadır (Harrison ve Bonning, 2010).

Canlı organizmaların kendi ürünleri olan mikrobiyal enzimler veya metabolitler zararlı böcekler ile mücadelede alternatif bir yol olarak düşünülmektedir (Huang ve Chen, 2008; Karasuda vd., 2003). Bu moleküllerin tek başlarına, kendi aralarında veya başka moleküller ile kombinasyonlar halinde kullanımları (Sayed ve Behle, 2017; Mantzoukas vd., 2013), kimyasal pestisitlerin çevre üzerindeki olumsuz etkilerini ve pestisit dirençlilik problemini çözebilecek (Gao, vd., 2012; Raymond, vd., 2007; Tabashnik vd., 2009) potansiyel uygulamalar olarak görülmektedir.

Bakülovirüs'ler ve entomopatojen bakteriler, böceklerde sıklıkla epidemilere sebep olan ve biyolojik mücadelede kullanılan mikroorganizma gruplarıdır (Francesca vd., 2018). Bakülovirüs ve entomopatojen bakterilerin bir kısmı, kitin polimerini parçalayan kitinaz enzimi üretmektedirler. Böceklerde bağırsak ve dış iskelet yapısı içerdikleri kitin polimeri nedeni ile, kitinaz enzimi tarafından hedef alınan başlıca kısımlardandır. Bu nedenle mikroorganizmalar tarafından kodlanan kitinaz enzimi zararlı böcekler ile mücadelede

kullanılabilecek potansiyel mikrobiyal ajanlardır (Liu vd., 2006).

Bu çalışmada *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcNPV), *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) ve *Serretia marcescens* kitinaz C proteinlerinin insektisidal etkileri, *Galleria mellonella* üzerinde test edilerek birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca kitinaz enziminin böcek üzerinde ki etkisinin Invertebrate iridescent virus (IIV6)'nın oral infektivitesine katkısı araştırılmıştır.

Escherichia coli BL21(DE3) konak hücresinde ifade edilen AcNPV, CpGV ve *S. marcescens*'e ait kitinaz proteinleri saflaştırılarak *G. mellonella* üzerinde farklı konsantrasyonlarda test edilmiştir. Kullanılan kitinazların insektisidal etkileri birbirlerine yakın olmakla birlikte CpGV kitinazının diğer iki kitinaza göre biraz daha fazla ölüm oluşturduğu gözlemlendi. CpGV kitinazından sonra en yüksek insektisidal etkiyi *Serretia marcescens*'in kitinaz C'si ve onu takiben de AcNPV kitinazı oluşturmuştur.

Kullanılan kitinaz konsantrasyonları arttıkça ölüm oranları da artmıştır. LC₅₀ değerlerine bakıldığında, 14.günde böceklerin yarısını öldüren konsantrasyon (LC₅₀) CpGV için 1958,961 ng/μl, *S. marcescens* için 2095,064 ng/μl ve AcNPV için 2318,318 ng/μl olarak tespit edilmiştir.

Hawtin ve arkadaşları (1997) tarafından yapılan bir çalışmada AcNPV kitinaz A proteini ile muamele edilmiş larvaların vücutlarında yumuşama ve sıvılaşma olduğu gösterilmiştir. Bu tezde de kitinaz proteini verildikten sonra ölen larvaların vücutlarında yumuşama olduğu görülmüştür. Raw ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, AcNPV kitinaz A (ChiA) proteininin böcek dokularını parçalayarak vücudun sıvılaşmasına neden olduğu ve dolayısı ile bu kitinazın böcek kontrolü için kullanılabilecek potansiyel yeni bir araç olabileceği ileri sürülmüştür. Söz konusu çalışmada AcNPV *ChiA* geni, *E. coli* hücrelerinde ifade edilmiştir. Ardından afinite kromatografisi ile saflaştırılan rekombinant protein, hem ekzo- hem de endo-kitinaz aktiviteleri göstermiş ve *Bombyx mori* larvalarının üzerinde insektisidal aktivitesi araştırılmıştır. Kullanılan kitinazın konsantrasyonuna bağlı bir şekilde konsantrasyon arttıkça ölüm oranlarının da arttığı belirlenmiştir.

Cydia pomonella granulovirus (CpGV) üzerinde yapılan çalışmalarda CpGV'nin hızlı öldürücü etkisinin olduğu (Federici BA,1997) ve CPGV kitinazının, enfekte olan larvaların sıvılaşmasında önemli rolünün bulunduğu tespit edilmiştir(Daimon vd., 2007). Daimon ve arkadaşları (2007) CpGV'nin kitinaz aktivitesininBmNPV kitinazına göre daha yüksek olduğunu belirtilmişlerdir. Bu tezde elde edilen sonuçlarda CpGV kitinazının insektisidal etkisinin, BmNPV gibi bir nucleopolyhedrovirüs (NPV) olan AcNPV'ye ait kitinazın etkisinden daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Helicoverpa armigera orijinli *S. marcescens* suşuna ait ChiA, ChiB ve ChiCgenleri tarafından kodlanan kitinaz proteinleri *Malacosoma neustria* ve *H. armigera* larvaları üzerinde test edilmiştir (Danışmazoğlu vd., 2015). Söz konusu çalışmada *S. marcescens* kitinaz C proteininin en yüksek insektisidal etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. Ozgen ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada *S.marcescens*'in kitinaz B ve C proteinleri kristal proteinleri içeren *Bacillus thuringiensis*'e aktarılmış ve oluşan rekombinant bakterinin *Galleria mellonella* üzerindeki insektisidal aktivitesi test edilmiştir. Ölüm oranları %45 ile %55 arasında kaydedilmiştir. Bu çalışmada ise *S.marcescens* 'in kitinaz C proteini saf olarak *Galleria mellonella* üzerinde test edilmiş ve 2095,064 ng/μl konsantrasyonda 50% civarında insektisidal etki oluşturmuştur.

baculovirus familyasının iki genusuna ait olan *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) ve *Granulavirus* (GV)'lar ile yapılan çalışmalara bakıldığında NPV'nin yalnız kullanıldığı testlere göre GV eklenip kombinasyonlar halinde uygulanması sonucundaki testlerde , düşük instardaki larvaların ölüm oranlarında artış kaydedilmiştir(Shigeyuki ve Chie,2007;Martin, 2000). GV ve NPV beraber uygulandıktan sonra NPV'nin tek başına kullanıldığı testlere oranla böceklerin yarısını öldüren konsantrasyon (LC₅₀) miktarlarında belirli bir azalma ve yarısını öldüren zaman (LT₅₀) sürelerinde kısalma olduğu tespit edilmiştir. Nitekim bu tez çalışmasında da, IIV6 ile birlikte uygulanan kitinaz C proteininin yalnız uygulanan IIV6'ya göre daha fazla insektisidal etki oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları, literatürde yapılan çalışmaları desteklemektedir ve bakteriyal ve viral kitinazların biyolojik mücadeledeki kullanımının

hızlandırılmasını teşvik etmektedir.

Sonuç olarak virüs ve bakteri genomlarından izole edilip *E. coli*'de ekspres edilen kitinaz enzimlerinin saflaştırılarak kullanımları, yeni biyopestisitlerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.



5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında Baculoviridae'ler familyasına ait *Autographa californica* *nucleopolyhedrovirus* (AcNPV) ve *Cydia pomonella* *granulovirus* (CpGV) kitinaz genlerinin klonlanması ve bu kitinazların daha önce klonlanması yapılmış *Serretia marcescens* kitinaz C proteini ile birlikte *Escherichia coli* konağında ifade edilmeleri gerçekleştirilmiştir. İfade edilen proteinler saflaştırılmış ve insektisidal etkileri *Galleria mellonella* üzerinde araştırılmıştır. Tezin ikinci kısmı olarakta kitinaz proteininin *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV6)'nın oral infektivitesini arttırıp arttırmadığı araştırılmıştır. Sonuçları maddeler halinde sıralayacak olursak;

1- AcNPV ve CpGV kitinaz genleri, dizayn edilen primerler yardımıyla viral genomlardan PCR ile çoğaltıldılar ve önce klonlama vektörü pJET1.2'ye, ardından da ekspresyon vektörü pET28a(+)'ya klonlandılar.

2- AcNPV, CpGV kitinaz proteinleri ve *Serretia marcescens* kitinaz C proteini *E.coli* BL21(DE3) hücresinde ifade edildiler.

3- Üretilen proteinler PAGE ve Western analizi yapılarak teyit edildi. Kitinaz proteinlerinin büyüklükleri AcNPV için yaklaşık 63 kDa, CpGV için yaklaşık 68 kDa ve *S. marcescens* kitinaz C proteini için yaklaşık 50 kDa büyüklüklerinde gözlemlendi.

4- Kitinaz proteinlerin insektisidal aktiviteleri üçüncü instar *Galleria mellonella* larvaları üzerinde araştırıldı.

5- Kitinaz proteinlerinin *G. mellonella* üzerindeki insektisidal etkilerinin birbirlerine yakın oldukları tespit edilmiştir. Bununla birlikte bir sıraya konulduğu zaman larvalar üzerinde en fazla insektisidal etkiyi CpGV kitinaz proteini gösterirken, bunu *S. marcescens* kitinaz C proteini ve ardından da AcNPV kitinaz proteini izlemiştir.

6- Kitinaz proteinlerinin, larvaların %50'sini öldüren konsantrasyonları (LC₅₀) ve yine bu proteinlerin larvaların yarısını öldürmesi için gerekli zamanlar (LT₅₀) hesaplanmıştır. En düşük LC₅₀ değeri insektisidal aktivite ile orantılı şekilde önce CpGV

ardından, *S. marcescens* kitinaz C proteini ve sonrada AcNPV kitinazı şeklinde sıralanmıştır. Ancak en düşük LT_{50} değerinin sıralanmasında ise insektisidal aktivitede ki sıra izlenmemiş, en başta yine CpGV bulunurken bunu AcNPV ve sonra da *S. marcescens* kitinaz C proteini izlemiştir.

7- Kitinaz proteininin IIV6'nın oral infektivitesine katkıda bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla *G. mellonella* üzerinde insektisidal aktivite testi yapıldı. Bu testte kitinaz ile birlikte uygulanan IIV6'nın yalnız başına virüs uygulanan kontrollere göre daha fazla insektisidal etki oluşturduğu gözlemlendi.



6. ÖNERİLER

Zararlı böceklerle mücadelede sentetik pestisitlere alternatif biyopestisitlerdir. Bu anlamda biyolojik mücadele için en çok kullanılan mikroorganizma grupları bakteriyel ve viral ajanlardır. Bu çalışmada da bakteri ve viral kaynaklı mikrobiyal ürünler *Galleria mellonella* larvaları üzerinde test edilmiştir.

Bu çalışmada ki kitinazların daha farklı böcek cinsleri üzerinde test edilmesi bakteri ve viral kaynaklı kitinazların etkilerinin karşılaştırılmasında daha kapsamlı bilgi verecektir. Aynı şekilde çalışılan kitinaz kaynaklarının sayısının artırılması da karşılaştırma sonuçları için daha sağlıklı bilgi verecektir.

Bu çalışmada kitinaz ve virüs kombinasyonunun etkisi araştırılmıştır. Başka çalışmalarda kitinaz ile birlikte diğer enzim veya böcekler üzerinde etkili olduğu bilinen diğer proteinler ile kombinasyonlar yapılarak insektisidal aktivite araştırılabilir.

Bunun dışında Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6) genomuna kitinaz genleri eklenebilir ve böylece doğal koşullara daha dayanıklı viral ajanlar kazanılmış olur. Son olarakta saflaştırılan kitinazlar ile başka entomopatojenler birlikte kullanılabilir ve insektisidal aktivite denemeleri yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Adrangi, S. ve Faramarzi, M.A., 2013. From bacteria to human: a journey into the world of chitinases, Biotechnol Adv., 31,8, 1786-1795.
- Aggarwal, C., Paul, S., Tripathi, V., Paul, B. ve Khan, M.A., 2015. Chitinase producing *Serratia marcescens* for biocontrol of *Spodoptera litura* (Fab) and studies on its chitinolytic activities, Ann .Agric. Res. New. Ser., 36 ,2, 132-137.
- Alexandratos, N. ve Bruinsma, J., 2012. World agriculture towards 2030/2050, ESA Working Paper, No. 12-03.
- Atwood, D. ve Paisley-Jones, C., 2017. Pesticide industry sales and usage. 2008-2012 market estimates, U.S. Environmental Protection Agency Report.
- Bahar, A.A., Sezen, K., Demirbağ, Z. ve Nałçacioğlu, R., 2012. The relationship between insecticidal effects and chitinase activities of Coleoptera-originated entomopathogens and their chitinolytic profile, Ann. Microbiol., 62, 647-653.
- Benbrook, C. M., 2000. Performance criteria for IPM: measuring IPM results. IPM in Oregon: Achievements and Future Directions, Special Report , 1020, 19-27.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A. ve Gupta, R. K., 2007. Bacterial chitinases: properties and potential, Critical reviews in biotechnology, 27,1, 21-28.
- Berini, F., Caccia, S., Franzetti, E., Congiu, T., Marinelli, F., Casartelli, M. ve Tettamanti, G., 2016. Effects of *Trichoderma viride* chitinases on the peritrophic matrix of Lepidoptera. Pest Manag. Sci. , 72,5, 980-989.
- Bilimoria, S.L., 1991. The Biology of Nuclear Polyhedrosis Viruses, Viruses of Invertebrates, Inc., 1, New York.
- Corrado, G., Arciello, S., Fanti, P., Fiandra, L., Garonna, A., Digilio, M.C., Lorito, M., Giordana, B., Pennacchio, F. ve Rao, R., 2008. The chitinase A from the baculovirus AcMNPV enhances resistance to both fungi and herbivorous pests in tobacco, Transgenic Res., 17 ,4, 557-571.
- Chandler, D., Bailey, A.S., Tatchell, G.M., Davidson, G., Greaves, J. ve Grant, W.P., 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management, Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci., 366,1573, 1987-1998.

- Chandrasekaran, R., Revathi, K., Nisha, S., Kirubakaran, S.A., Sathish-Narayanan, S. ve Senthil-Nathan, S., 2012. Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab, Pestic. Biochem. Physiol., 104 ,1, 65-71.
- Cohen-Kupiec, R. Ve Chet, I., 1998. The Molecular Biology of Chitin Digestion, Current Opinion in Biotechnology, 9, 270-277.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S. ve Chet, I., 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens, Appl. Environ. Microbiol., 61,5, 1720-1726.
- Czaja, K., Góralczyk, K., Struciński, P., Hernik, A., Korcz, W., Minorczyk, M., Lyczewska, M. ve Ludwicki, J.K., 2015. Biopesticides – towards increased consumer safety in the European Union, Pest Manag. Sci., 71,1, 3-6.
- Dahiya, N., Tewari, R. ve Hoondal, G., 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review, Appl. Microbiol. Biotechnol., 71,6, 773-782.
- Daimon, T., Katsuma, S., Kang, W. ve Shimada, W., 2007. Functional characterization of chitinase from *Cydia pomonella* granulovirus, Arch. Virol., 152, 1655-1664.
- Da Silva Amorim, R. V., de Souza, W., Fukushima, K. ve de Campos-Takaki, G. M., 2001. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture, Braz. J. Microbiol., 32, 20-23.
- Danişmazoğlu, M., Demir, İ., Sezen, K., Muratoğlu, H. ve Nalçacıoğlu, R., 2015. Cloning and expression of chitinase A, B, and C (*chiA*, *chiB*, *chiC*) genes from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities, Turk. J. Biol., 39, 78-87.
- Deshpande, M. V. , 1986. Enzymatic degradation of chitin and its biological applications, J. Sci. Ind. Res., 45,273-281
- Ehler, L.E ve D.G Bottrell, 2000. The illusion of Integrated Pest Management, Issues in Science and Technology, 61-64.
- Federici, B.A., 1997. Baculovirus pathogenesis. The baculoviruses, 33-59, New York.
- Flach J., Pilet, PE. ve Jolles, P., 1992. What's new in chitinase research, Experimentia., 48,701–706
- Francesca, B., Chen, K., Nady, G., Morena, C., Gianluca, T. ve Flavia M. , 2018. Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management, Biotechnology Advances, 36, 818-838.

- Fuchs, R.L., McPherson, S.A. ve Drahos, D.J., 1986. Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase, Appl. Environ. Microbiol., 51, 504-509.
- Gooday G., 1999. Aggressive and defensive roles of chitinases, EXS,87, 157–169.
- Harrison, R. ve Bonning,B., 2010. Toxins , 2, 935-953.
- Haki, G.. ve Rakshi, S., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, Bioresource Technology, 89, 17-34
- Hardy, M., 2014. Resistance is not futile: it shapes insecticide discovery, Insects ,5,1, 227-242.
- Hart, P., Pfluger, H., Monzingo, A., Hoihi, T ve Robertus, J., 1995. The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8Å resolution, J. Mol. Biol., 248,402-413.
- Hayakawa, T., G.F. Rohrmann ve Y. Hashimoto 2000. Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculovirus, Virology, 278, 1-12.
- Hawtin, R., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C., Gooday, G., King, L., Kuzio, J. ve Possee, R., 1997. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirusinfected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes, Virology, 238 ,2, 243-253.
- Herrera-Estrella. A. ve Chet. I., 1999. Chitinases in biological control. EXS, 87,171-184.
- Huang, C. ve Chen, C., 2008. Synergistic interactions between chitinases ChiCW and fungicides against plant fungal pathogens, J. Microbiol. Biotechnol., 18 ,4, 784-787.
- Hjort, K., Presti, I., Elväng, A., Marinelli, F. ve Sjöling, S., 2014. Bacterial chitinase with phytopathogen control capacity from suppressive soil revealed by functional metagenomics, Appl. Microbiol. Biotechnol., 98,6, 2819-2828.
- Hermosa, M., Grondona, I., Iturriaga, A. , Díaz, J. , Castro, C., Monte, E.ve I. García, 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp, Appl. Environ. Microbiol., 66,1890-1898.
- Herniou, E.A., T. Luque, X. Chen, J.M. Vlak, D. Winstanley, J.S. Cory ve D.R. O'Reilly, 2001. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny, J. Virol., 75,8117-8126.
- Hobel CF, Hreggvidsson GO, Marteinson VT, Bahrani-Mougeot F, Einarsson JM, Kristjansson JK (2005) Cloning, expression and characterization of a highly

- thermostable family 18 chitinase from *Rhodothermus marinus*. Extremophiles, 9,53-64.
- Jakob, N., Muller, K., Bahr, U. ve Darai, G., 2001. Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate iridovirus: coding strategy of the genome of Chilo iridescent virus, Virology, 286,182-196.
- Jakob, N. ve Darai, G., 2002. Molecular anatomy of Chilo iridescent virus genome and the evolution of viral genes, Virus Genes, 25, 299-316.
- Jakob, N., Kleespies, R., Tidona, C., Müller, K., Gelderblom, H. ve Darai, G., 2002. Comparative analysis of the genome and host range characteristics of two insect iridoviruses: Chilo iridescent virus and a cricket iridovirus isolate, Gen. Virol., 83, 463-470.
- Jhon ,Z., 1984 . Chitin, Chitosan, and Related Enzymes, Academic press, INC, london, 20
- Kadowaki, S., Saskiawan, I., Watanabe, J., Yamamoto, K., Bunno, M., Ichihara, Y. ve Kumagai, H., 1997. Transglycosylation activity of β N-acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicum* and its application to synthesis of a drug carrier, Ferment Bioeng., 83,341-345.
- Karasuda, S., Tanaka, S., Kajihara, H., Yamamoto, Y. ve Koga, D., 2003. Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides, Biosci. Biotechnol. Biochem., 67 ,1, 221-224.
- Laine L ve Lo C, 1996. Diagnosis of fungal infections with a chitinase, PCT Int Appl Wo 9802742 A122 (CA 128, 86184).
- Lee, C., ,2009, Chitin, Chitinases and Chitinase-like Proteins in Allergic Inflammation and Tissue Remodeling, Yonsei Med. J., 50,1, 22-30
- Monreal, J. ve Reese, E., 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*, Can. J. Microbiol., 15, 689-696.
- Martin, S., 2000. Effect of Two Granulosis Viruses on the Activity of the Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Nuclear Polyhedrosis Virus, Journal of Economic Entomology, 93,6,1633-1637, America.
- Mendonsa, E., Vartak, P., Rao, J. ve Deshpande, M., 1996. An enzyme from *Myrothecium verrucaria* that degrades insect cuticle for biocontrol of *Aedes aegypti* mosquito, Biotechnol Lett., 18,373-376
- Muzzarelli, R.A.A, 1977. Chitin, Pergamon, Oxford, 155-177.

- Muzzarelli, R.A.A., Mattioli-Balmonte, M., Pugnaroni, A. ve Biagini, G., 1999. Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing, EXS, 87,251-264.
- Neeraja, C., Subramanyam, R., Moerschbacher, B. ve Podile, A., 2010. Swapping the chitin-binding domain in Bacillus chitinases improves the substrate binding affinity and conformational stability, Mol. BioSyst., 6,8, 1492-1502.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S. ve Rai, V., 2013. Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. BioMed Research International Volume, 18.
- Olson, S., 2015. An analysis of the biopesticide market now and where it is going, Outlook Pest Manag., 26, 5, 203-206.
- Ozgen, A., Sezen, K., Demir, I., Demirbag, Z. ve Nalcacioglu, R., 2013. Molecular characterization of chitinase genes from local isolate of *Serratia marcescens* and their contribution to the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains, Curr. Microbiol., 67,4, 499-504.
- Parnell, J., Berka, R., Young, H., Sturino, J., Kang, Y., Barnhart, D. ve DiLeo, M., 2016. From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms, Front. Plant Sci., 7, 1110.
- Patil, S., Ghormade, V. ve Deshpande, M., 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration, Enzyme Microb Technol., 26,473-483.
- Robinson, P., 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications, Essays in Biochemistry, 59, 1-41.
- Prasanna, L., Eijsink, V., Meadow, R. ve Gåseidnes, S., 2013. novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential, Appl. Microbiol. Biotechnol., 97, 4, 1601-1611.
- Prokopy, R., 2003. Two decades of bottom-up, ecologically based pest management in a small commercial apple orchard in Massachusetts. Agric. Ecosyst Environ., 94,299-309.
- Rao, R., Fiandra, L., Giordana, B., de Eguileor, M., Congiu, T., Burlini, N., Arciello, S., Corrado, G. ve Pennacchio, F., 2004. AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae, Insect Biochem. Mol. Biol., 34, 11, 1205-1213.
- Roberts, W. ve Selitrennikoff, C., 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity, J. Genet. Microbiol., 134,169-176.

- Revah-Moiseev, S. ve Carrod, P., 1981. Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single cell protein, Biotechnol Bioeng., 23,1067-1078.
- Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I., Koncz-Kalman, Z., Koncz, C., Schell, J. ve Zilberstein, A., 1996. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae, Appl. Environ. Microbiol., 62,10, 3581-3586.
- Shaikh, S. ve Deshpande, M., 1993. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research, World J. Microbiol. Biotechnol., 9,468-475.
- Saurabh, B., 2018. Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, IOPSCIENCE , 2.
- Souza, C., Almeida, B. ve Colwell R., 2011. The importance of chitin in the marine environment, Mar Biotechnol., 13, 823.
- Stern, V., Smith, R., Bosch, R. ve Hagen, K., 1959. The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid. The integrated control concept, Hilgardia, 29,81-101.
- Suzuki, K., Taiyoji, M., Sugawara, N., Nikaidou, N., Henrissat, B. ve Watanabe, T., 1999. The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases, Biochem., 343,587-596
- Shimono, K., Matsuda, H. ve Kawamukai, M. , 2002. Functional expression of chitinase and chitosanase, and their effects on morphologies in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 66,1143-1147
- Shigeyuki, M. ve Chie, G., 2007. Enhancement of Nucleopolyhedrovirus Infectivity Against *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) by Proteins Derived from Granulovirus and a Fluorescent Brightener, Journal of Economic Entomology, 100,4,1075-1083.
- Swiontek, M., Jankiewicz, U., Burkowska, A. ve Walczak, M., 2014. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection, Curr. Microbiol., 68,1, 71-81.
- Taira, T., Ohnuma, T., Yamagami, T., ASO, Y., Ishiguro, M. Ve Ishihara, M., 2002. Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell wall, Biosci. Biotechnol. Biochem., 66,970-977.
- Theilmann, D., Blissard, G., Bonning, B., Jehle, J., O'Reilly, D., Rohrmann, G., Thiem, S. Ve Vlak, J., 2005. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Academi Press, San Diago. Baculoviridae*, 177-185.

URL-1,[https://www.medchemexpress.com/Chitinase IN 1.html](https://www.medchemexpress.com/Chitinase-IN-1.html) 30 Nisan 2020

Volkman, L., 1995. Baculovirus bounty, Science, 269,1834-1834.

Wang, S., ve Chang, W., 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in shrimp and crab shell powder medium, Appl. Environ. Microbiol., 63 ,2, 380-386.

Williams, T., Barbosa-Solomieu, V., ve Chinchar, V., 2005. A decade of advances in iridovirus research, Adv. Virus. Res., 65,173-248.

Williams, T. ve Hernandez, O., 2006. Costs of cannibalism in the presence of an iridovirus pathogen of *Spodoptera frugiperda*, Ecol. Entomol., 31, 106-113.

Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology, Second Edition. Ellis Horwood Limited: Chichester.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Kaşgar'da doğdu. İlkoku ve ortaokulu 1996–2005 yılları arasında kendi köyü de tamamladıktan sonra, liseyi 2005–2008 yıllarında Yarkent ilçesi 1.lisesi'nde tamamladı. 2008-2009 Eğitim Öğretim yılında Xin Jiang Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2013 yılı Haziranda bu bölümden mezun oldu ve ardından 2014 Yılı Mart ayına kadar Mekt ilçesi 1.lisesi'nde öğretmen olarak çalıştı. 2014–2017 yılları Mısır'da Arapça ve İngilizce eğitim aldı. 2017-2018 Eğitim-Öğretim yılında Pamukkale Üniversitesi Dil Öğretim Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Türkçe öğrendi. 2018-2019 Eğitim-Öğretim yılı Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'nın (YTB) “Türkiye Bursları” programıyla Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve hâlen burada öğrencidir. Yabancı dili Çince, İngilizce ve Arapça'dır.