

***BEAUVERIA BASSIANA* İZOLATLARINDAN KİTİNAZ
ENZİMİ ELDESİ VE BAZI ZARARLI BÖCEKLERE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**OBTAINING CHITINASE ENZYME FROM *BEAUVERIA*
BASSIANA ISOLATES AND THE INVESTIGATION OF ITS
EFFECTS ON SOME PESTS**

ÖZNUR İREM YAYALAR

PROF. DR. NEVİN KESKİN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2019

ÖZNUR İREM YAYALAR 'ın hazırladığı "*Beauveria bassiana* İzolatlarından Kitinaz Enzimi Eldesi ve Bazı Zararlı Böceklerle Etkisinin Araştırılması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Aysun ERGENE

Başkan



Prof. Dr. Nevin KESKİN

Danışman



Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Üye



Prof. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY

Üye



Doç. Dr. Mahmut KABALAK

Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

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

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

beyan ederim.

20/06/2019

ÖZNUR İREM YAYALAR

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

20/06/2019

ÖZNUR İREM YAYALAR

ÖZET

BEAUVERIA BASSIANA İZOLATLARINDAN KİTİNAZ ENZİMİ ELDESİ VE BAZI ZARARLI BÖCEKLERE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Öznur İrem YAYALAR

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nevin KESKİN

Haziran, 2019 + 106 Sayfa

Günümüzde biyolojik mücadele ajanlarının tarımsal zararlılarla mücadelede kullanımı ciddi bir önem kazanmıştır. Biyolojik mücadele ajanı olarak mikroorganizma preparatları, fungus sporları ve predatör böcekler kullanılmaktadır. Entomopatojen canlıların tarım zararlıları için kullanılması maliyetlidir ve stabil tutulmaları zordur. Günümüzde kitinolitik enzimler, entomopatojen mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Kitinaz enzimi, canlı organizmanın metaboliti olduğundan, teknik açıdan saklama ve kullanma yönünden elverişlidir. Entomopatojen fungus olan *Beauveria bassiana* daha önce biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmış ve biyolojik ajan olarak

başarısı kanıtlanmış bir organizmadır.

Bu çalışmada, Türkiye'den çeşitli lokalitelerden izole edilmiş çeşitli *Beauveria bassiana* suşlarındaki kitinolitik enzimlerinin kısmi ve ileri saflaştırma işlemi yapılmıştır. Deneylere 50 farklı izolat ile başlanmış, katı besiyerlerinde karides kabuklarıyla kitinolitik enzimlerin güçlü bulunduğu 10 izolat ile çalışmalara devam edilmiştir. Enzim saflaştırılması için, çeşitli sıvı besi ortamları denenmiş ve en yüksek aktiviteyi ortaya çıkaran Kobalt Besiyeri tarafımızca oluşturulmuştur. Kobalt besiyerinde en yüksek aktiviteyi Lüleburgaz-1(Lül-1) suşu göstermiş ve çalışmalara Lüleburgaz-1(Lül-1) suşu ile devam edilmiştir. Kaba enzim ekstraktı için en iyi üretim koşulları 28°C'de, 72 saat, pH 3,5 olarak belirlenmiştir. En uygun inokülüm miktarı 1000 µl ve maksimum enzim aktivitesi için en uygun bekletme sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin geniş bir sıcaklık ve pH aralığında dayanıklı olduğu çalışmalarla görülmüştür. Enzimin ileri saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve kolon kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır. Saflaştırma işlemleri sonrasında enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Kısmi ve ileri saflaştırılan enzim ekstraktlarının moleküler ağırlıkları SDS-PAGE yöntemiyle belirlenmiş ve ~44 kDA bulunmuştur. Kısmi ve ileri saflaştırılan enzim ekstraktları, depo zararlısı model organizmalar olan *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) ve *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvaları üzerinde daldırma ve püskürtme yöntemleri kullanılarak denenmiştir. Daldırma yöntemi, püskürtme yöntemine göre daha etkili bulunmuştur.

İstatistiksel analizler sonucunda, enzimin uygulandığı her yöntem istatistiksel olarak kontrol grubundan farklı bulunmuştur. Çalışma sonucunda, daldırma yöntemiyle uygulanan enzim ekstraktlarının, ortalama ölüm sürelerine bakılarak daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmanın daha ileri saflaştırma aşamalarına öncü olması ve kitinolitik enzimlerin kullanımının biyolojik mücadeleye kazandırılması beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: *Beauveria bassiana*, kitinaz enzimi, *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*

ABSTRACT

OBTAINING CHITINASE ENZYME FROM *BEAUVERIA BASSIANA* ISOLATES AND THE INVESTIGATION OF ITS EFFECTS ON SOME PESTS

Öznur İrem YAYALAR

Master, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nevin KESKİN

June, 2019 + 106 Pages

Abstract

Today, the use of biological control agents in combating agricultural pests has gained serious importance. Microorganism preparations, fungus spores and predator insects are used as biological control agents. The use of entomopathogenic organisms for agricultural pests is costly and difficult to maintain. Today, chitinolytic enzymes are obtained from entomopathogenic microorganisms. Since the enzyme kitinase is the metabolite of living organisms, it is technically useful for storage and use. *Beauveria bassiana*, the

entomopathogenic fungus, has previously been used as a biological control agent and is a proven organism as a biological agent.

In this study, partial and advanced purification of chitinolytic enzymes in the various *Beauveria bassina* strains which has been isolated in the Turkey soil was performed. The experiments were started with 50 different isolates and studies were continued with 10 isolates which were found to be strong in chitinolytic enzymes with shrimp shells on solid medium. Various liquid media have been tested for enzyme purification and Cobalt Medium has been produced by the highest activity. Lüleburgaz-1 (Lül-1) strain showed the highest activity in cobalt medium and the studies were continued with Lüleburgaz-1 (Lül-1) strain. The best production conditions for the partially purified enzyme were 28°C, 72 hours, pH 3.5. The optimum inoculum amount of 1000 µl and the optimum waiting temperature for maximum enzyme activity was determined as 50°C. The purified enzyme was found to be resistant to a wide range of temperature and pH. Ammonium sulfate precipitation, dialysis and column chromatography methods were used for further purification of the enzyme. Decrease in enzyme activity was observed after purification. The molecular weights of partial and advanced purified enzyme extracts were determined by SDS-PAGE method and found to be ~ 44 kDA. Partial and advanced purified enzyme extracts were tested by using dipping and spraying methods on the *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae, which are warehouse pest model organisms. The dipping method was found to be more effective than the spraying method.

As a result of statistical analysis, each method in which the enzyme was applied was statistically different from the control group. As a result of the study, it was concluded that the enzyme extracts applied by dipping method were more effective by looking at the average death time. It is expected that the study will lead to further purification stages and the use of chitinolytic enzymes will be introduced into biological control.

Keywords: *Beauveria bassiana*, chitinase, *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*

TEŞEKKÜR

Her zaman fikirleriyle ve destekleriyle yolumu aydınlatan, deney aşamalarında ve tezimde karşılaştığım zorluklara yardımcı olan sevgili danışmanım Prof. Dr. Nevin Keskin hocama, laboratuvarında ve tezimde karşılaştığım her türlü zorluğu çözmeme yardımcı olan ekip arkadaşlarım sevgili İrem Çelebier ve sevgili Meltem Ulusoy'a, deneylerin tüm aşamalarında bana yardımcı olan özel çalışma öğrencilerimiz sevgili Hazal Yılmaz ve sevgili Müge Özdemir'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Deneyle ilgili ihtiyaç duyduğumuz teknik ekipman ve kimyasal madde temininde yardımcı olan Hacettepe Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı'na ve Özgecan Erdem'e yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Doğduğu günden beri bana yaşama sevinci olan, deneylerime benimle gelip bana yardım eden biricik kardeşim İzel'e, sevgilerini ve maddi, manevi desteklerini her zaman hissettiğim fedakâr anneme ve fedakâr babama, bana her zaman inandıkları ve hep en iyisi için çabalamama teşvik ettikleri için çok teşekkür ederim. Deney aşamalarında karşılaştığım zorluklarda beni her zaman motive eden, alanı olmamasına rağmen deneylerimde yardımcı olan, sevgisiyle her zaman bana destek olan nişanlım Görkem Şahin'e teşekkür ederim.

Deney aşamalarında tüm olanaklarını bana tüm kalbiyle açan Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü ailesine, tüm hocalarıma ve tüm çalışanlara gelişimime sayısız katkısından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından FHD-2018-16656 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İçindekiler Tablosu

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Entomopatojen Funguslar	3
2.1.1 Entomopatojenik Fungusların Tarihçesi	4
2.1.2. Entomopatojenik Fungusların Etki Mekanizmaları	5
2.2. <i>Beauveria bassiana</i> 'nın Genel Özellikleri.....	8
2.2.1. <i>Beauveria bassiana</i> 'nın Salgıladığı Litik Enzimler	9
2.3 Kitinazlar	11
2.3.1. Kitinaz Enziminin Biyolojik Mücadeledeki Rolü	13
2.3.2. Kitin	15
2.3.3. Kitin ve Türevlerinin Uygulama Alanları.....	16
2.4.Enzim Safılaştırma Yöntemleri.....	17
2.4.1. Santrifüjleme	17
2.4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi (Salting Out).....	17
2.4.3. Diyaliz.....	18
2.4.4. Kromatografi.....	19

2.4.5. Elektroforez	20
2.4.6. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)...	20
2.5. Hedef Organizma Olarak Seçilen Depo Zararlısı Böcekler	21
2.5.1 <i>Galleria mellonella</i> (Büyük Balmumu Güvesi)	21
2.5.2 <i>Tenebrio molitor</i> (Un Kurdu).....	22
3.GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	24
3.2. Çalışmada Kullanılan Model Organizmaların Laboratuvar Koşulları Altında Üretimi	24
3.2.1. <i>Galleria melonella</i> 'nın Laboratuvar Koşulları Altında Üretimi	24
3.2.2. <i>Tenebrio molitor</i> 'un Laboratuvar Koşulları Altında Üretimi	24
3.3.Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	25
3.3.1. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	25
3.3.2. Sabouraud Dextrose Agar + Yeast Extract (SDAY)	25
3.3.3. Basal Medium Besiyeri.....	25
3.3.4. <i>Serratia</i> Medium Besiyeri	26
3.3.5 Medium A Besiyeri	26
3.3.6 Medium C Besiyeri	27
3.3.7 Kobalt Medium Besiyeri.....	28
3.3.8 Karides Kabuklu Besiyeri	28
3.3.9 Kolloidal Kitinli Besiyeri	29
3.3.10 <i>Galleria melonella</i> Üretim Besiyeri	29
3.3.11 Tween 80	29
3.3.12 Çalışmada Kullanılan Tamponlar	30
3.4. Kolloidal Kitinin Hazırlanması	30
3.5. DNS (Bernfield Reaktifinin Hazırlanması).....	30
3.6. Alkalın Çözeltisinin Hazırlanması.....	31
3.7. Çalışmada Kullanılan <i>B. bassiana</i> Suşlarının Çoğaltılması	31

3.7.1 Spor Solüsyonunun Hazırlanması	31
3.7.2 Spor Sayısının Belirlenmesi	32
3.8. Kitinaz Üreten Suşların Saptanması	33
3.8.1. Kitinaz Enzimi Üretimi İçin Uygun Besiyerinin Seçimi	33
3.9. Kaba Enzim Ekstraktı.....	33
3.9.1. DNS Yöntemiyle İndirgen Şeker Tayini (Aktivite Ölçümü).....	34
3.10. Örneklerdeki Protein Miktarı Tayini.....	35
3.11. Örneklerdeki N-Asetil Glukozamin Miktarı Tayini.....	36
3.12. Total Ünitenin Hesaplanması	37
3.13. Enzim Spesifik Aktivitesinin Hesaplanması.....	37
3.14. Kitinaz Enzimi Üretimi Üzerine Farklı Parametrelerin İncelenmesi	37
3.14.1. Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	37
3.14.2. Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi	38
3.14.3. Besiyerinde Optimum pH Aralığının Belirlenmesi.....	38
3.14.4. En Uygun İnokülüm Miktarının Belirlenmesi.....	38
3.14.5. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	39
3.15. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	39
3.16. Diyaliz Membran	39
3.17. Kolon Kromatografisi.....	40
3.18. Elektroforez.....	40
3.18.1. Nondenatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi	40
3.18.2. Yükleme Jelinin Hazırlanması	41
3.18.3. Ayırma Jeli Hazırlanması	41
3.18.4. Örneklerin Jel Üzerine Yüklenmesi	42
3.18.5. Moleküler Ağırlık Hesaplaması.....	43
3.19. Elde Edilen Enzim Ekstraktlarının Hedef Organizmalar Üzerinde Denenmesi.....	43

3.19.1. Ekstraktların <i>Galleria mellonella</i> (Büyük Balmumu Güvesi) Larvaları Üzerinde Denenmesi.....	43
3.19.2. Ekstraktların <i>Tenebrio molitor</i> (Un Kurdu) Larvaları Üzerinde Denenmesi	44
3.20. İstatistiksel Yöntemler	44
4.SONUÇLAR	45
4.1. <i>Beauveria bassiana</i> İzolatlarının Çoğaltılması	45
4.2. <i>Beauveria bassiana</i> Suşlarının Spor Sayımlarının Yapılması	45
4.3. Katı Besiyeri Ortamında Kitin Kullanımın Tespiti	45
4.4. Kaba Enzim Ekstraktı	47
4.5. Enzim Aktivitesi Ölçümü için Substrat Hazırlanması	48
4.6. Enzim Üretim Ortamı Olarak Denenen Sıvı Besiyeri Ortamları	48
4.7. En Yüksek Enzim Aktivitesi Gösteren <i>Beauveria bassiana</i> İzolatının Belirlenmesi	49
4.8. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	51
4.9. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Üretim Ortamı Sıcaklık Değerinin Saptanması.....	53
4.10. Enzimim Sentezlenmesi İçin İdeal İnokülüm Miktarının Belirlenmesi... ..	54
4.11. Enzimin Sentezi için Uygun pH Değerinin Saptanması.....	56
4.12. Enzim Aktivitesine Bekletme Sıcaklığının Etkisinin Saptanması	57
4.13. Safılaştırma İşlemleri Sonrası Aktivite Karşılaştırılması	58
4.13.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi Sonundaki Enzim Aktivitesi	58
4.13.2. Kolon Kromatografisi Sonrası Enzim Aktivitesi.....	59
4.14. SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlık Hesaplanması	60
4.15. Elde Edilen Enzim Ekstraktlarının Model Organizmalar Üzerindeki Sonuçları.....	61
4.15.1. Ekstraktların <i>Galleria mellonella</i> (Büyük Balmumu Güvesi) Larvaları Üzerindeki Sonuçları	61
4.15.2. Ekstraktların <i>Tenebrio molitor</i> (Un Kurdu) Larvaları Üzerindeki Sonuçları	64

5. TARTIŞMA.....	68
KAYNAKLAR.....	75
EKLER	88
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Entomopatojen fungusların enfeksiyon aşamaları

Şekil 2.2. Böceklere karşı entomopatojen fungus patojenitesi [109]

Şekil 2.3. Kitinaz enzimi moleküler konfigürasyonu [51]

Şekil 2.4. Amonyum Sülfat Çöktürmesi [79]

Şekil 2.5. Diyaliz aşamaları [79]

Şekil 2.6. *Galleria mellonella* yaşam döngüsü [16]

Şekil 2.7. *Tenebrio molitor* yaşam döngüsü [16]

Şekil 3.1. Neubauer lamı sayım alanı [103]

Şekil 3.2. Kör ve Örnek Tüplerinin Hazırlanması

Şekil 3.3. Total Protein Standart Eğrisi

Şekil 3.4. N-Asetil Glukozamin Standart Eğrisi

Şekil 4.1. *Beauveria bassiana* izolatlarının çoğaltılması

Şekil 4.2. Karides kabuklu besiyerinde kitin kullanımı tespiti

Şekil 4.3. Kolloidal kitinli besiyerinde kitinaz enzimine bağlı açılma zonları

Şekil 4.4. Kaba Enzim Ekstraktı

Şekil 4.5. Enzim üretim ortamı olarak denenen sıvı besiyerleri

Şekil 4.6. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Şekil 4.7. İnkübasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Şekil 4.8. *Beauveria bassiana* izolatlarının enzim aktivitesi

Şekil 4.9. İnkübasyon sıcaklığının enzim aktivitesine etkisi

Şekil 4.10. İnokülüm miktarının enzim aktivitesine etkisi

Şekil 4.11. Çeşitli pH derecelerinin enzim aktivitesine etkisi

Şekil 4.12. Çeşitli bekletme sıcaklıklarının enzim aktivitesine etkisi

Şekil 4.13. Kısmi saflaştırma ve ileri saflaştırma işlemleri sonrası enzim aktivitesi

Şekil 4.14. SDS-PAGE jel üzerinde kısmi saflaştırılmış ve ileri saflaştırılmış enzim ekstraktlarının moleküler ağırlıklarını belirleyen bant görüntüleri

Şekil 4.15. *Galleria mellonella* ile kurulan deney düzeneği

Şekil 4.16. *Galleria mellonella* kontrol grubu ve deney gruplarının günlere göre ölüm oranları

Şekil 4.17. *Tenebrio molitor* ile kurulan deney düzeneği

Şekil 4.18. *Tenebrio molitor* kontrol grubu ve deney gruplarının günlere göre ölüm oranları

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. *Beauveria bassiana* izolatlarının en yüksek enzim aktivitesi gösteren Lül-1 suşuna göre ortalama fark ve standart hataları

Çizelge 4.2. Çalışılan inkübasyon sıcaklıkları ile kontrol grubu arasındaki ortalama fark ve standart hata

Çizelge 4.3. Çeşitli inkübasyon sıcaklıklarının en yüksek aktivite gösteren 28°C sıcaklığına göre ortalama fark ve standart hataları

Çizelge 4.4. Çeşitli inokülüm miktarlarının en yüksek aktivite gösteren 1000 µl inokülüm miktarına göre ortalama fark ve standart hataları

Çizelge 4.5. Çeşitli pH derecelerinin en yüksek aktivite gösteren pH 3.50 derecesine göre ortalama fark ve standart hataları

Çizelge 4.6. Çeşitli bekletme sıcaklıklarının en yüksek aktivite gösteren 50°C sıcaklığına göre ortalama fark ve standart hataları

Çizelge 4.7. Kaba enzim ekstraktına göre kısmi ve ileri saflaştırma aşamalarının ortalama fark ve standart hataları

Çizelge 4.8. *Galleria mellonella* kontrol grubu ve deney gruplarının ortalama ölüm değerleri ve ortalama ölüm zamanları

Çizelge 4.9. *Galleria mellonella* kontrol grubu ve deney grubunun LT50 değerleri

Çizelge 4.10. *Tenebrio molitor* kontrol grubu ve deney gruplarının ortalama ölüm değerleri ve ortalama ölüm zamanları

Çizelge 4.11. *Tenebrio molitor* kontrol grubu ve deney grubunun LT50 değerleri

SİMGELER VE KISALTMALAR

μ l : mikrolitre

μ mol : mikromol

nm : nanometre

s : saat

M : molar

rpm : revolutions per minute (dakikadaki dönüş sayısı)

nm : nanometre

U : Unit (Bir enzim ünitesi)

GlcNAc : N-Asetil Glukozamin

DNS Bernfield Reaktifi

BSA Bovin Serum Albumin

FCR Folin Ciocalteu Reagent,

SSF Solid State Fermentation

DNS Dinitrosalisilik Asit

SDS Sodyum Dodesil Sülfat

PAGE

Poliakrilamid

jel

elektroforezi

1.GİRİŞ

Tarım zararlıları, tarımsal üretim başladığından beri insanlığın sorunu olup, mahsül verimini düşürmek, mahsülde hastalığa neden olmak gibi etkilerle ürün kayıplarına sebep olurlar. Tarım zararlılarıyla mücadelede kimyasal pestisitler ve yakın zamanda biyolojik ajanlar kullanılmaya başlanmıştır. Kimyasal pestisitlerin kalıntı bırakma, patojene direnç oluşturma, hedef dışı faydalı organizmalara zarar verme gibi etkileri bilinmektedir. Günümüzde, az kalıntı bırakan kimyasal maddeler ve biyolojik mücadele yöntemlerinin önemi artmıştır. Bu amaçla biyolojik mücadelede canlı organizmaların preparatları kullanılarak patojen organizmalarla mücadele edilmektedir.

Tarım zararlılarının biyolojik kontrolünde başka bir yaklaşım ise mikroorganizmaların yerine metabolitlerinin kullanılmasıdır. Biyolojik mücadelede kitinaz enziminin kullanılabilirliği, çeşitli çalışmaların sonuçlarıdır. [1,2].

Enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere, günlük yaşantımızda yer edinmişlerdir. Genellikle endüstrinin her alanında, çoğu zaman mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikrobiyal enzimler yan ürünler oluşturmaz. Çoğaltılması kolay olduğu için fazla miktarda üretilebilirler [3]. Kitin, N-asetil-D-glukozaminin β -1,4 bağlı olduğu doğada en bol bulunan polisakkaritlerden biridir [4].

Kitinin enzimatik hidrolizinde kitinolitik enzimler görev almaktadır. Kitinazların, bitkiler, bakteriler, funguslar ve molluskalar tarafından üretildikleri bilinmektedir. Kitinazlar, böceklerde tüy dökme ve kabuk değiştirme etkinliklerinde görev almaktadır. Omurgalı hayvanlarda ve böceklerle beslenen kuşlarda da mide mukozasında ve pankreasta salgılanmaktadır [5,6,7]. İnsan kan serumunda da bulunan kitinazın, fungal enfeksiyonlarla mücadele etmek üzere savunmada rolü olduğu tahmin edilmektedir. [6,7]

Entomopatojen (böcek patojeni) bakteri ve funguslar tarafından sentezlenen çeşitli kitinolitik enzimler, biyolojik mücadelede kullanılmaktadır. Entomopatojen mikroorganizmalar, çeşitli aktiviteleri eş zamanlı gerçekleştirebildiğinden kimyasal insektisitlere göre büyük bir avantaj sağlarlar [8]. Dolayısıyla entomopatojen organizmalardan elde edilen metabolitler, biyolojik pestisit olarak kullanılabilir [9].

Kitinaz gibi biyolojik pestisitlerin insektisit aktivitesi, epikütikula içerisinde enzimlerin temasını arttıran polioksietilen izotridesil eter gibi ilave maddelerle geliştirilebilmektedir [10].

Beauveria türleri hemen hemen tüm ekosistemden kolaylıkla izole edilip, üretilen funguslardır [11]. *Beauveria spp.* birçok özelliği sebebiyle en çok kullanılan biyolojik kontrol ajanlarından ve zararlılarla mücadele için en çok üretilen biyolojik preparatlardan biridir [10]. Toprakta yaygın olarak bulunan saprofit bir fungus olduğu ve toksin üretebildiği bilinmektedir [11]. *Beauveria spp.*'nin kış aylarında aktivite gösteren böceklerle karşı en aktif kullanılan fungus olduğu belirtilmiştir [12].

Beauveria bassiana'nın ekstraselüler olarak kitinaz salgıladığı başka çalışmalarla belirlenmiştir [13]. Kitinazın aktif olduğu sıcaklık aralığı, antifungal ve insektisit özelliği, aktif olduğu pH aralığı elde edildiği kaynağa göre, hatta aynı tür mikroorganizmanın farklı izolatlarında bile değişebilmektedir. Bunun nedeni enzimin farklı genler tarafından kodlanması ve sonuçta farklı proteinler olmasıdır [14].

Bu çalışmada Türkiye'den çeşitli lokalitelerden izole edilen entomopatojen fungus *Beauveria bassiana* izolatlarından, kısmi saflaştırma ve ileri saflaştırma yöntemleriyle kitinaz enziminin eldesi amaçlanmış olup, daha sonra bu preparasyonlar çeşitli depo zararlısı böcekler üzerinde denenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

Kimyasal pestisitler, çevreye verdikleri zarar ve insan sağlığına olumsuz etkilerine rağmen, 55 yıldan fazla bir zamandır tarımsal zararlılarla mücadelede kullanılmaktadır [15]. Kimyasal pestisitler, hedef dışı faydalı organizmaları da olumsuz olarak etkilemektedir. Ekosistemde besin zinciri yoluyla birikerek gittikçe daha toksik hale gelmektedirler. Tarımsal zararlıların, kimyasal pestisitlere karşı direncinin artmasıyla, yeni kimyasal ilaçların keşfi yoluna gidilmektedir. Bu sebeplerle, son yıllarda biyolojik mücadele ve doğa dostu mücadele yöntemlerinin değeri artmış, biyolojik koruma ürünlerine dair çalışmalar hız kazanmıştır [15].

Biyolojik mücadele, zararlıların sebep olduğu hastalık gibi durumları engellemede, zararlının doğal dışmanının kullanılması prensibine dayanır. Canlı organizmalar ve predatör böcekler dışında, doğaya dost olan diğer yöntemler de biyolojik mücadele başlığı altında toplanabilir. Biyolojik mücadelede kullanılan diğer yöntemler; fiziksel, mekanik ve kimyasal olarak üçe ayrılır. Fiziksel mücadele, zararlının yaşadığı ortam şartları değiştirilerek canlı organizma kullanmadan yapılır. Mekanik mücadele, zararlılarla feromonlu yapışkan tuzaklar gibi araçlar kullanılarak yapılan mücadeledir. Kimyasal mücadelede ise, toprakta az kalıntı bırakan ve nadasla tamamen uzaklaştırılabilen pestisitlere göre daha hafif kimyasallar tercih edilmektedir. [16]

Beauveria bassiana, uzun zamandır bitki koruma mikroorganizması olarak en çok çalışılan entomopatojen (böcek patojeni) funguslardan biridir. Fungusun tarım zararlılarına karşı mücadelede en etkili organizmalardan biri olduğu ve toksin ürettiği çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir [12,16].

2.1. Entomopatojen Funguslar

Entomopatojen funguslar, uzun zamandır orman ve tarım zararlılarını etkisiz hale getirmek için kullanılmaktadır. [17]. Bu funguslar, böceklerin dış kütikulasında

enfeksiyona sebep olarak iç organlarına doğru yayılmaktadır. Enfeksiyona sebep olmaları için böcek tarafından yenmeleri gerekmez. Böceği deri yoluyla enfekte edip yayılabilirler. Entomopatojen fungusların pek çok türü zararlı böceklere karşı kullanılmakta ve ticari preparatları üretilmektedir [18].

Entomopatojen funguslar, Zygomycetes, Ascomycetes, Deuteromycetes, Chytridiomycetes ve Oomycetes şubeleri içinde yer alabilirler [19]. Çoğu, iki aşamalı yaşam döngüsüne sahiptir. Bunlar, böcek üzerinde ve çevrede serbest halde yaşadıkları aşamalar olarak birbirini izlemektedir. Böcek-konakçı enfeksiyon seviyeleri, sıcaklık aralığı ve üreme oranları gibi etkenler, türler ve izolatlar arasında farklılık gösterebilir [20].

Bugüne dek bilinen 90 cinse ait 700 entomopatojenik fungus türü tanımlanmıştır. Bunlardan *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* (*Isaria fumosorosea*), *Verticillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* gibi türler, zararlıyla mücadelede kullanılan en etkili türler olarak bilinmektedir [21].

Entomopatojenik bir fungus türü olan *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae, Ascomycota), ilk kez 170 yıl kadar önce tanımlanmıştır. Steinhaus, *Beauveria bassiana*'nın biyolojik kontroldeki önemi üzerine çalışmalar yapan ilk kişilerden biri olarak kabul edilmiştir [22].

Beauveria bassiana, beyaz veya sarımsı kolonilerle karakterizedir. Konidyaları ise renksiz, elipsoidal üreme göstermektedir. Genellikle kar topları veya pamuk toplarına benzetilmektedir. Sistemik olarak yapılan son çalışmalar *Beauveria* cinsinin, telemorf cinsi *Cordyceps* ile ilişkili olduğunu göstermiştir [23,24].

2.1.1 Entomopatojenik Fungusların Tarihçesi

Entomopatojen funguslarla ilgili en eski çalışmaların 1800'lü yılların başında, ipekböceği endüstrisine ciddi zararlar veren hastalıkların çalışılmasıyla başladığı tahmin edilmektedir. Agostino Bassi, *Beauveria bassiana*'nın ipekböceklerinde kireç hastalığına sebep olduğunu göstermiştir (1773-1856). İpekböceği hastalıkları

araştırmalarının devam ettiği süreçte, fungusun diğer böceklere de bulaştığının farkedilmesiyle entomopatojen fungusların zararlılarla mücadelede kullanılması fikri doğmuştur [25].

Ardından Pasteur ve Leconte gibi bilim insanları fungusların böceklere karşı kullanılabilirliğini ne sürmüştür. Rus bilim insanı Elie Metchnikoff (1845-1916), ağustos böceklere üzerinde yeşil muscardin maddesini denemiş ve enfekte eden fungusu *Entomoptora anisopliae* (*Metarhizium anisopliae*) olarak adlandırmıştır [25].

Daha sonra bilinen adıyla *Metarhizium anisopliae*, Krassilstchik tarafından sahada buğday biti zararlısı üzerinde kullanılmıştır [25].

Bu çalışmaların ardından, 1940'lar sonrasında hızla büyüyen kimyasal pestisit endüstrisi sebebiyle, ekolojik çözümlerin aranması uzun bir süreliğine gölgede kalmıştır. 2000'li yıllar itibariyle artan çvre, sağlık bilinciyle, çvresel mücadele yöntemleri üzerine yapılan araştırmalar artmıştır [25].

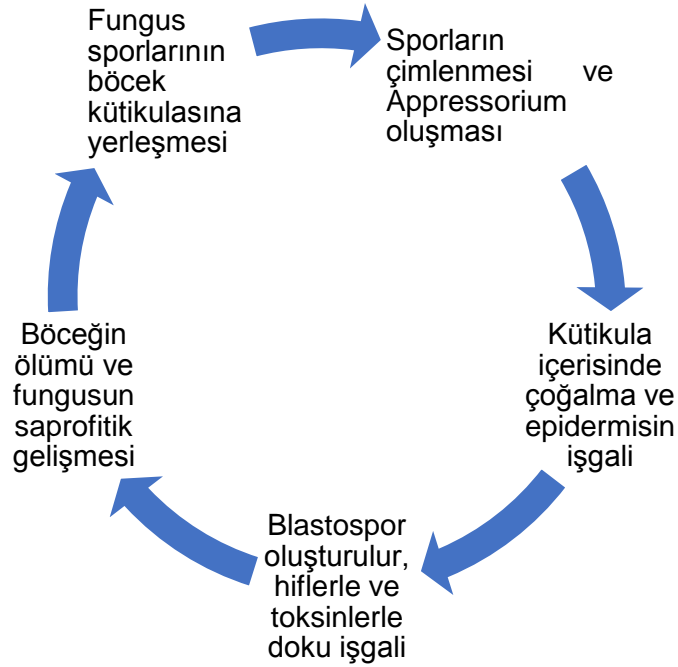
2.1.2. Entomopatojenik Fungusların Etki Mekanizmaları

Entomopatojen funguslar, böceklerin solunum deliklerinden, vücut açıklığından veya kütikula üzerinden enfekte edebilir. Bu zellikler, böceğin beslenme düzeni nasıl olursa olsun, böcekleri aktif bir şekilde enfekte edebileceğini göstermektedir [26].

Kök kurdunun oluşturduğu fungus enfeksiyonunun üzerinde yapılan çalışmalar, entomopatojen fungusun, 6 fazda enfeksiyon döngüsünü tamamladığını göstermiştir [27]. Sporlar genellikle eşeysiz remeyeyle oluşturulur ve ilk aşama böceğe penetrasyon (tutunma) aşamasıdır. Bu aşama sinyal proteinleriyle olabildiği gibi hidrofobik etkiden ötürü de olabilmektedir. Penetrasyon aşamasının ardından, germ tüpü ve appressorium adı verilen yapının oluşması için konağın bağışıklığı kırılır ve çimlenme başlar [28]. Tutunma işlemi genellikle bcekte melanizasyona (renk değişimine) yol açmaktadır [29].

Çimlenmiş spor kütikula içinde tutunur ve dallanır. Fungus, bu tutunma sırasında proteaz, kitinaz gibi litik enzimler sentezleyerek konağın epidermis tabakasına doğru ilerler. Tutunmanın ardından filamentli yapılar blastosporu oluşturur. Bu yapı böcek hemosölünde tomurcuklanarak çoğalan formudur. Tekrar filamentöz yapılara geçiş, epidermis tabakası altında oluşur, böcek iç organ ve yapıları tamamen istila edilir. Fungus, konağı toksin üreterek veya iç organların işlevsel kaybına sebep olarak ölüme sürükler. Ölmüş olan böcekten etrafa yayılan sporlar, tekrar aynı döngüye başlayıp canlılığını sürdürür [27].

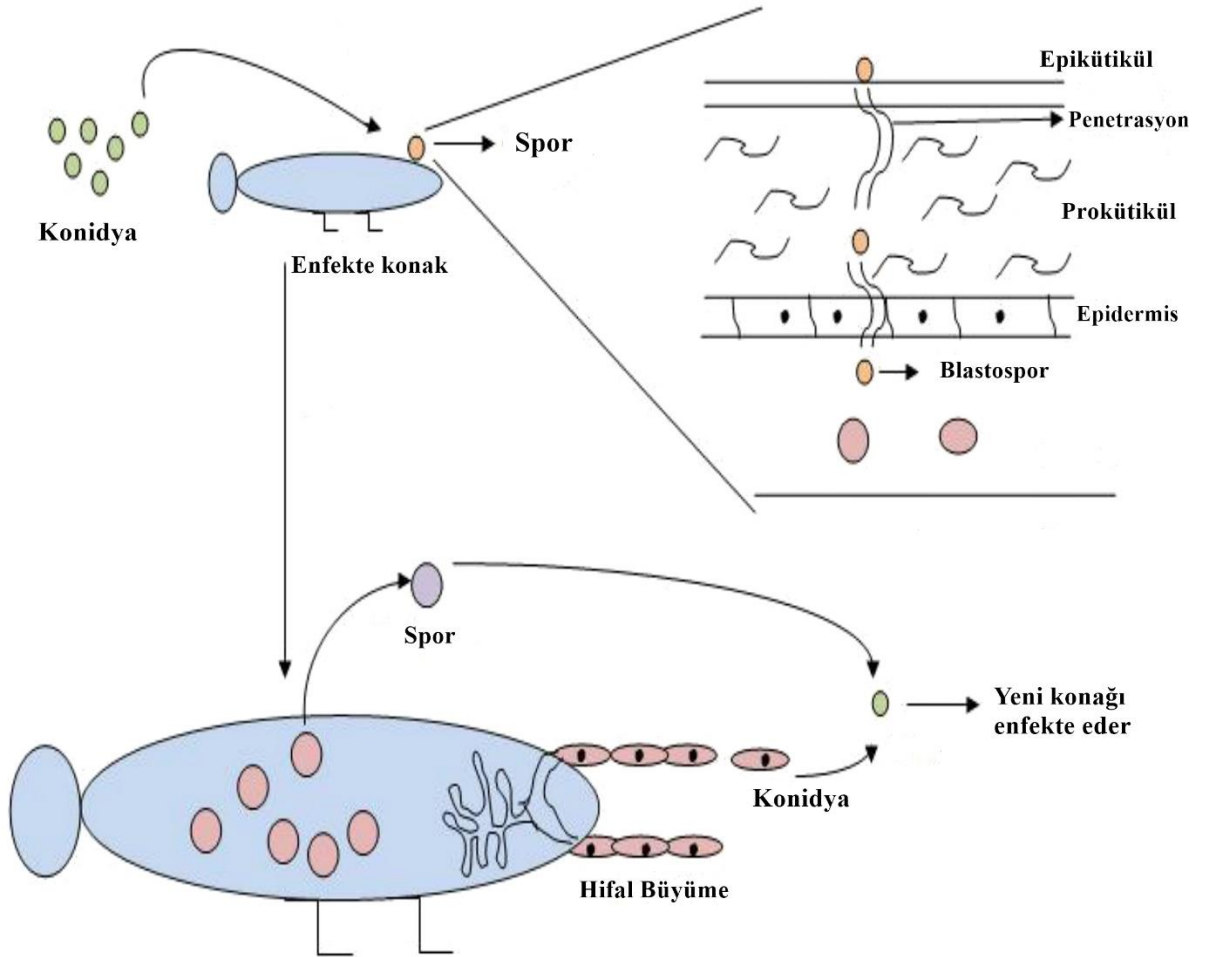
Sucul ortamdaki entomopatojen funguslarda, başlangıçta yer alan tutunma işlemi zoosporların kese oluşturmasıyla gerçekleşir. Konak canlı değilse, fungus dinlenme sporu adı verilen yapıyı oluşturur. Bu yapı yüksek sıcaklık, düşük pH gibi zor şartlara dayanabilmektedir. Uygun şartlarda enfektif spor haline gelebilmektedir. Entomopatojen fungusların salgıladıkları toksinler, fungus konak iç organlarına nüfuz etmeden önce konağın ölmesine sebep olur [28].



Şekil 2.1. Entomopatojen fungusların enfeksiyon aşamaları

Entomopatojenik fungusların farklı metabolitler üreterek konağını birçok spesifik yolla öldürdüğü, yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Kimyasal olarak birçok farklı metabolitin, patojenik etkileri gözlemlenmiştir. Örneğin; *Beauveria bassiana* için beauverisin, bassianin, oksalik asit, bassianolid, beauverolidler, tenellin, oosporein, bassiakridin gibi metabolitlerdir. *Metarhizium spp.* için ise, 28 tıpe destruksin, sitokalsin C, hidroksifungenin A ve B olarak belirlenmiştir [30,31].

Entomopatojenik fungusların patojenik etki gösterebilmesi için toksin üretmeye ihtiyacı olmadığı da yapılan çalışmalarca belirlenmiştir. Entomopatojenlerin, toksin üretmediği zaman da böceklerin ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir [32].



Şekil 2.2. Böcekler karşı entomopatojen fungus patojenitesi [109]

Diğer entomopatojenik funguslarda olduğu gibi *Beauveria* türleri de konağı deri üstünden enfekte etmektedir. Konidiaların tutunması (penetrasyon), böcek kütikulasının hidrofilik özelliği sayesinde kolaylaşmaktadır. Çimlenme ve enfeksiyonun başarılı olması konakçıya ve optimal sıcaklık, nem gibi bazı çevresel faktörlere bağlıdır. Çimlenme, antimikrobiyal aktiviteye sahip olabilen kısa zincirli yağ asitleri, aldehitler, balmumu esterleri, ketonlar ve alkoller gibi belirli kesikli lipidlerden de etkilenir. Genellikle, *B. bassiana*'nın çimlenmesi enfeksiyondan yaklaşık 10 saat sonra başlar ve 20–25 °C'de 20 saatte tamamlanır [30].

Penetrasyon aşamasının ardından, germ tüpü ve appressorium adı verilen yapı oluşturulur. Penetrasyon aşamasında proteazlar, kitinazlar ve lipazlar tutunmaya yardımcı olan enzimlerdir. Başarılı penetrasyondan sonra, fungus hemolenf içinde dağılan hifler üretir, bu da fungusun vejetatif büyümesini ve toksinlerin üretimi ile konakçı böceklerin diğer dokularını istila etmesini sağlar. Örneğin, bu aşamada *Beauveria brongniartii* tarafından oosporein metaboliti üretilir. Böcek gövdesinin istilası sırasında, fungus hemolenf ve yağ dokudaki besinleri tüketir. Enfeksiyon süreci, böceğin ölümü ve kadavradan tekrar sporların yayılmasıyla (saprofitik gelişim) kendini tekrar eder [30].

2.2. *Beauveria bassiana* 'nın Genel Özellikleri

Beauveria bassiana, cinsinin en yaygın türü olmakla birlikte genellikle tropik ve ılıman bölgelerde bulunmaktadır. *Beauveria bassiana*, Türkiye, Fildişi Sahilleri, Afrika, Nepal, Sibirya, Bahamalar, Japonya ve Yeni Zelanda'da görülmüştür. Bu zamana kadar havadan, ormanlardan, nemli topraklardan, bataklıklardan, çöllerden, sıcak su kaynaklarından, bitki rizosferlerinden, böceklerin üzeri gibi çeşitli habitatlardan izole edilebilmiştir [30].

Entomopatojen fungusların çevrede dağılımını biyotik ve abiyotik faktörler etkilemektedir. Abiyotik faktörler; sıcaklık, nem ve solar radyasyondur. Bu faktörler entomopatojen fungusların etkin şekilde kullanılmasından ve ticari kullanımından da sorumludur [16,30].

Beauveria bassiana entomopatojen fungusunun üremesi için optimal sıcaklık aralığı 23-28 °C iken maksimum sıcaklık 30-38 °C'dir [33].

B. bassiana sporlarının termal ölüm noktası ise 10 dakika boyunca 50 °C'dir. Yüksek sıcaklık, böcekler ile temas etmeden önce bir fungusu inaktive edebilir veya konakçı böceğin sıcaklık gereksinimlerine bağlı olarak böcek içindeki büyümeyi azaltabilir. Aynı şekilde düşük sıcaklıklar da çimlenmeyi ve büyümeyi azaltabilir veya durdurabilir [30].

Nem faktörü, *B. bassiana* sporlarının canlılığını koruması için çok önemli bir faktördür. Ölü konaktan saprofitik gelişim sırasında, yeni bir konakçıya tutunana dek, canlılığın korunması ve çimlenmenin gerçekleşmesi için nispi nem oranının %92-100 arasında olması gerekmektedir [30].

Solar radyasyon, özellikle UV-B (290-330 nm) ve UV-A (330-400 nm), fungus sporlarının kalıcılığını etkileyen en zararlı çevresel faktördür. Güneş ışığı altında yapılan laboratuvar deneylerinde, tüm *B. bassiana* sporlarının %99'u, UV-C'de yaklaşık 16 dakika sonra ve UV-A ve UV-B'de yaklaşık 31 dakika sonra inaktive olduğu belirtilmiştir [34].

2.2.1. *Beauveria bassiana*'nın Salgıladığı Litik Enzimler

Entomopatojen fungusların etki mekanizmasında hidrolize edici birçok enzim tanımlanmıştır. Bunlar lipazlar, proteazlar ve kitinazlardır [35].

2.2.1.1 Lipazlar

Lipazlar (triasilgliserol asilhidrolazlar, EC 3.1.1.3), fizyolojik ve endüstriyel potansiyellerinden dolayı geniş çapta araştırılan serin hidrolazlardır. Bu enzimler, gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerinin ester bağlarının sentezi ile hidrolizini katalize eder [36].

Lipazlar, 1980'lerden beri endüstriyel anlamda artan bir taleple karşılaşmıştır. Lipaz enzimi çok yönlüdür. Süt ve gıda üretiminde, deterjan endüstrisinde, eczacılık ve kozmetikte yaygın olarak kullanılan çok sayıda farklı reaksiyonu katalize ederler [37].

Mikrobiyal lipazlar, ticari olarak üretilen lipazların ana tipidir. Son yıllarda, ticari alanlardaki lipazların büyük potansiyeli nedeniyle, esas olarak mikrobiyal kökenli lipazlar üzerine çalışmalar artmıştır. Fungal ve bakteriyel lipazların salgılanması, dış besin kaynaklarından alınan besin emilimini kolaylaştırmaktadır. Patojenik mikroorganizmalar, yeni bir konakçı istila etmek için, lipaz enzimi salgırlar. Funguslar, endüstriyel uygulamalar için en önemli lipaz kaynaklarıdır. Bunun sebebi, fungal enzimlerin genellikle hücre dışı olarak salgılanması ve fermentasyon ortamından ekstraksiyonu kolaylaştırmasıdır [38].

Böcek kütlesinin dış tabakası olan epikütikula, hidrofobiktir ve mikrobiyal saldırıya karşı ilk engel olarak işlev görür. Heterojen bir lipid karışımı, uzun zincirli alkenler, esterler ve yağ asitleri, böcek kütikülünün ana bileşenidir. Lipazlar, böcek iç kısmında bulunan lipoproteinlerin, yağların ve balmumlarının ester bağlarının hidrolizinden sorumludurlar [39]. Lipazlar kütiküllere önemli ölçüde nüfuz eder ve bütünlüğü parçalayarak degradasyonu başlatır. Epikütikül tabakasının degradasyonu, prokütikülde yer alan proteinli materyali degrade eden fungal proteazının üretimi ile takip edilmektedir. Lipaz yardımı ile sporların epikütikulaya yapışması, kütikül mumsu yüzeyindeki yağ asitlerinin ve alkenlerin bozunmasını başlatan zorunlu bir ön aşamadır [40].

2.2.1.2. Proteazlar

Proteazlar, proteinlerin peptid bağlarını böler ve bunları küçük peptitler ve amino asitlere ayıran büyük bir hidrolitik enzim grubunu oluştururlar. Proteazlar, neredeyse tüm hücresel fonksiyonlarda rol oynadıkları için, bitkiler ve hayvanlarda olduğu kadar, virüsler de dahil olmak üzere tüm mikroorganizmalarda bulunurlar. Bundan dolayı mikroorganizmalar bu enzimlerin tercih edilen kaynağı olarak kullanılmaktadır [41].

Endüstriyel olarak enzimlerin üretiminde, üretilen enzimlerin %75'i bitki, hayvan ve mikroorganizma kaynaklarından elde edilen hidrolaz ve proteazlardır. Proteazlar, enfektif süreçte önemli olarak kabul edilen enzimlerdir. Proteazlar bu özellikten dolayı endüstriyel talep oluşturur ve endüstriyel üretimleri yüksektir [42].

Epikütikülün lipazlar tarafından parçalanmasından sonra böceği istila eden funguslar, protein materyalini bozan büyük miktarlarda Pr1 (serin-proteaz) üretir. Diğer taraftan, amino peptidazlar ve ekzopeptidazlar tarafından amino asitlere indirgenmiş proteinlerin daha ileri degradasyonu, entomopatojenik funguslara besin sağlamak için yapılmaktadır [43].

En çok çalışılan proteolitik enzimler serin proteaz (Pr1) ve tripsin benzeri proteaz (Pr2)'dir. Proteaz Pr1'in moleküler yapısı, iki disülfür köprüsünü oluşturan beş sisteinden oluşur. Pr1 ve Pr2 aktiviteleri *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi* ve *Metarhizium flavoviride'* de belirlenmiştir [43,44]. Bu proteazlar, ilk kütikül degradasyon aşamasında salgılanır ve AMPc'nin aracılık ettiği protein kinaz A'yı (PKA) aktive ederek sinyal transdüksiyon mekanizmasını uyarırlar.[45] Pr1 proteazın, fungusun hücre dışına tutunmasında kütikül enfeksiyonunu başlattığı, çalışmalarla doğrulanmıştır [42]. Ayrıca, proteaz Pr1'in entomopatojenik funguslarda virülans göstergesi olduğu bulunmuştur [46].

2.3 Kitinazlar

Kitin doğada en çok bulunan polimerlerden biridir. β -1,4 N-Asetil Glukozamin birimlerinden oluşmaktadır. Fungal hücre duvarlarında ve omurgasız organizmaların dış iskeletinde bulunmaktadır [47].

Uluslararası Enzim Komitesi (UIBMB) tarafından son yapılan düzenlemeye göre, sınıflandırmada kitini yıkan 2 enzim olduğu kabul edilmiştir. Bunlar Kitinaz [E.C. 3.2.1.14] ve N-Asetilglukozaminidaz [E.C. 3.2.1.30]'dır. [48]

Kitinazlar, kitin polimerinin β -1,4 bağlarını hidrolize eder, N, N'-diasetilkitobioz oluşturur. Kitinin tamamen enzimatik hidrolizi sonucunda N-asetil glukozamin

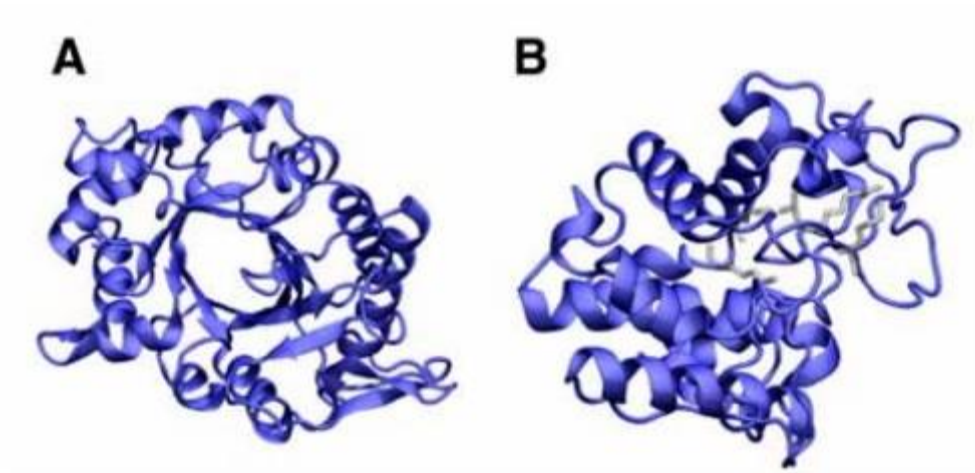
(GlcNAc) monomeri oluşmaktadır. Kitinaz enzimi bitkiler, funguslar, bakteriler ve omurgasızlar arasında yaygın bir dağılım göstermektedir [49].

Kitinazlar, entomopatojen funguslarda germinasyon, hifal büyüme, morfogenez, beslenme ve rekabette proteazlarla iş birliği yapmaktadır. Çeşitli çalışmalarla entomopatojen funguslarda kitinazın en önemli görevleri şu şekilde belirlenmiştir:

- 1) Fungus hücre duvarında veya besin kaynağı olarak kullanılan eklembacaklıların dış iskeletlerindeki kitinin yıkımı,
- 2) Funguslarda hif büyümesi, dallanma, otoliz ve rekabet sırasında hücre duvarlarının yeniden modellenmesi,
- 3) Aynı ekolojik niş içerisinde bulunan diğer funguslardan korunma [50].

Kitinazlar, hidrolaz enzim grubundan Glikozid hidrolaz grubunda bulunur. Glikozid hidrolazlar grubundaki 135 aileden 18. (GH18) ve 19. (GH19) ailelere dahildir. Farklı organizmalardaki kitinazlar, moleküler yapıları temelinde ve fizikokimyasal yapılarına göre ayırt edilmektedir. Glikoliz hidrolaz 18 ailesi kitinazları; bakterilerde, funguslarda, virüslerde, hayvanlarda ve yüksek yapılı bitkilerde bulunur. Glikoliz hidrolaz 19 ailesi kitinazları ise, yüksek yapılı bitkilerde ve bazı bakterilerde bulunur [51].

GH18 ailesi kitinazlarının katalizi, ürünlerin anomerik konfigürasyonlarını taşıyan substrata dayalı katalizi içermektedir. GH18 ailesi, allosaminidin tarafından inhibe edilmektedir. GH19 ailesi kitinazlarının katalizi ise, hidrolize poli- β -(1,4)-N-asetilglukozamin (NAG) kalıntısının anomerik konfigürasyonunu tersine çeviren bir asit-baz mekanizmasıdır. GH19 ailesi kitinazların inhibitörleri amidrazonlar ve amidinlerdir [51].



Şekil 2.3.Kitinaz enzimi moleküler konfigürasyonu (Şekil A:GH18 kitinaz konfigürasyonu, B:GH19 kitinaz konfigürasyonu) [51]

Kitinazlar; böcekler, bakteriler, virüsler, bitkiler ve omurgalılar tarafından morfogenez, patogenez, parazitlik ve savunma gibi farklı amaçlar için sentezlenirler [52].

2.3.1. Kitinaz Enziminin Biyolojik Mücadeledeki Rolü

Zararlı böcek ve organizmaların, mevcut doğal düşmanları, rekabetçiler ve diğer kendi çoğalabilen biyolojik varlıkların yardımıyla ekonomik zarar eşiğinin altında tutulmasına biyolojik mücadele denilmektedir [53].

Kimyasal pestisitlerin ekosistemler üzerine olumsuz etkisi olması, besin zincirinde birikmesi, zararlı böceklerin direnç gelişimine sebep olması ve insan sağlığına olan zararları günümüzde daha çok bilinmektedir. Son on yıl içerisinde bilinçli tüketicilerin artmasıyla biyolojik mücadeleye ağırlık verilmiştir ve zararlılarla mücadelede biyolojik mücadele yöntemleri kullanılarak mücadele edilmektedir [53].

Kitinolitik enzimler üreten bakterilerin, patojenik fungus türlerinin in vitro büyümesini inhibe etme ve sera deneylerinde fitopatojenik fungusların sebep olduğu bitki hastalıklarını iyileştirme etkileri bilinmektedir [54].

Bakteriyel kitinazlar daha önce birçok çalışmada biyolojik pestisit olarak denenmiş ve böcek öldürücü etkileri gözlemlenmiştir. *Serratia marcescens*'in alkali pH'da aktif olarak en az iki kitinaz içerdiği belirlenmiş, oral yolla verildiğinde *Spodoptera litura* larvalarında yüksek mortaliteye neden olduğu bulunmuştur [55]. *S. marcescens*'ten üç kitinaz (ChiA, ChiB ve ChiC) gen bölgesi belirlenmiş, kitinaz enzimi izole edilerek *Malacosoma neustria* ve *Helicoverpa armigera* larvaları üzerinde insektisidal aktivite gösterdiği saptanmıştır [56].

Bacillus subtilis, kitinaz sentezi için en çok tercih edilen mikroorganizmalardan biridir. *B. subtilis*'ten saflaştırılmış bir kitinazın oral yolla verilmesinden sonra *Spodoptera litura* larvalarının gelişimini azalttığı, mortaliteye sebep olduğu gösterilmiştir. Bakteriyel kitinazların, oral yolla böceğe verilmesinin sebebi, orta barsak epitelyumuna daha kolay ulaşmaları ve daha çabuk etki edebilmeleridir [57]. Son zamanlarda bakteriyel kaynaklı kitinaz çalışmalarında kullanılan *Pseudomonas fluorescens*'den saflaştırılan kitinaz, çay zararlısı olan *Helopeltis theivora* üzerinde öldürücü etki göstermiştir [58].

Fungal kitinaz kaynakları olarak, en çok araştırılan entomopatojen fungus türlerinden *Pochonia* spp., *Arthrobotrys* spp., *Paecilomyces* spp. biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabilir [44].

Paecilomyces javanicus'tan izole edilen kitinaz enzimi, pamuk kök nematodu olan *Meloidogyne incognita*'ya karşı test edilmiş ve nematod yumurta kabuğunun kitin tabakasında incelmeye sebep olmuş, yavruların gelişimi üzerine olumsuz etkiler göstermiştir [59].

Monacrosporium thaumasium ve *Duddingtonia flagrans* funguslarından fungal kitinaz enzimi sentezlenmiş, her ikisinden elde edilen enzimin de nematosidal etkisi olduğu gösterilmiştir [60,61].

Trichoderma spp.'den izole edilen endokitinaz enzimi tahıl kist nematodu olan *Heterodera avena* üzerinde etkili olmuş, zararlıının kist formundan çıkmasını engellemiştir [62].

Yapılan çalışmalara göre bakteriyel ve fungal kaynaklı kitinazlar, tarım için zararlı olan fungus ve böcek enfeksiyonlarına karşı biyolojik kontrol ajanı olarak etkili olmuştur. Bu çalışmaların ışığında, önümüzdeki yıllarda biyolojik bir kontrol ajanı olarak kitinazın, tarım zararlıları üzerinde ticari olarak formülasyonunun geliştirileceği tahmin edilmektedir [94].

2.3.2. Kitin

Kitin (poli β -(1→4)- *N*-asetil- *D*-glukozamin), ilk olarak 1800lü yıllarda tanımlanmış olup, selülozdan sonra doğada en bol bulunan polisakkarittir. Kabukluların, böceklerin ve fungusların dış iskeletinde bulunan ve dayanıklılık katan yapı malzemesidir [64,65].

Yaygın olarak doğada bulunmasına rağmen, kitinin ana ticari kaynakları yengeç ve karides kabukları olmuştur. Endüstriyel işlemede kitin eldesi için, deniz kabuklularında önce kalsiyum karbonat çözdürülür ve ardından deproteinizasyon işlemi için asitle muamele edilir. Bunlara ilaveten, artık pigmentleri uzaklaştırmak ve renksiz bir ürün elde etmek için genellikle bir renk giderme aşaması eklenir [65].

Kaynağına bağlı olarak kitin, üç polimerik forma sahiptir. Bunlar kristal bölge içindeki zincirlerin farklı düzenlenmesi ile oluşan α , β ve γ kitindir. α kitin, en fazla bulunan ve kolayca elde edilebilen formdur. β kitinde moleküller paralel bir düzende toplanır, bu da daha zayıf moleküller arası güçlere sebep olur. Bu yüzden β kitinin α kitine göre daha az kararlı olduğu düşünülmektedir. Çözülme ve şişme halinde β kitin α kitine dönüşür fakat tersi söz konusu değildir. α ve β kitinlere nazaran γ kitin daha nadir bulunmaktadır. γ kitinin, α ve β formlarının bir karışımı veya ara formu olduğu düşünülmektedir. γ kitin hem paralel hem de anti paralel bir düzene sahiptir. Farklı polimerik formlar farklı koşullar altında kullanılır. Örneğin; α kitin bu üç polimerik form arasında en sert olanıdır ve eklembacaklıların dış

iskeletlerinde, molluska kabuklarında ve planktonlarda bulunur. Diğer yandan β ve γ kitin, esnekliğin ve yumuşaklığın gerektiği bölgelerde bulunur. β kitin fungal hücre duvarlarının temel bileşenidir. γ kitin ise mürekkep balığının mide duvarında bulunur [65].

2.3.3. Kitin ve Türevlerinin Uygulama Alanları

Kitin ve türevleri, medikal alan başta olmak üzere, ziraatte, gıda endüstrisinde, kozmetikte, tekstilde ve biyoteknolojik proseslerde günümüzde çok yaygın bir kullanım alanına sahip olmuştur [66].

Medikal alanda; yara bandı ve sargı bezi geliştirilmesinde önemli bir kan pıhtılaştırıcı madde olarak, yanık tedavilerinde, kontrollü ilaç salımında, cerrahi uygulamalarda ve kontakt lens yapımında kullanılmaktadır [67,68].

Ziraatte; tohum kaplanmasında, fungusit, insektisit ve nematosit olarak, bitki büyümesini güçlendirici gübre olarak kullanımları bilinmektedir [69,70].

Gıda endüstrisinde; yiyecek katkı maddesi, doğal kıvamlaştırıcı madde, yiyeceklerin raf ömrünü uzatmak için kaplamada, antimikrobiyal film yapımında, yenilebilir film yapımında, renk stabilizasyon maddesi olarak, emülgatör ve jelleştirici ajan olarak, kolestorel düşürücü ve yağ tutucu etkisinden dolayı zayıflama maddesi olarak kullanılmaktadır [71].

Kozmetikte; saç şekillendirici maddelerin yapımında, cilt nemlendiricilerin yapımında ve deodorantların yapımında kullanılmaktadır [72].

Tekstilde; kumaş boyanabilirliğini artırıcı ve antimikrobiyal özellik kazandırıcı madde olarak, polyester kumaşların anti-statik özelliklerini iyileştirici madde olarak kullanılmaktadır [73,74].

Biyoteknolojide; atık su arıtımında ağır metallerin uzaklaştırılmasında, hidrojel yapımında, kromatografik yöntemlerde kitosan-aljinat film yapımında, doku

mühendisliğinde kitosan-jelatin iskelet oluşturulmasında, protein saflaştırma ve enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadır [75,76,77].

Kitinazların ise, biyolojik mücadelede; pestisit ve fungusit olarak, atık endüstrisinde; tek hücre proteini üretiminde, kabuklu deniz canlılarının atıklarının gideriminde, medikal alanda; astım ilaçlarının yapımında, antitümör ve kolesterol dengeleyici olarak kullanımları bilinmektedir. [77]

2.4.Enzim Saflaştırma Yöntemleri

Enzim saflaştırmada kaynak türüne göre birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Hücre içi enzimler için hücre duvarı ve hücre zarı parçalanır. Hücre içi enzimlerin izole edilmesinde fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Fiziksel yöntemler, ezme, ozmotik şok, tampon çözelti içerisinde sonikasyon, santrifüjleme gibi yöntemlerdir. Kimyasal yöntemler ise, organik çözücüler ve deterjanlar ile hücre duvarının yıkımının sağlanması işlemidir [78].

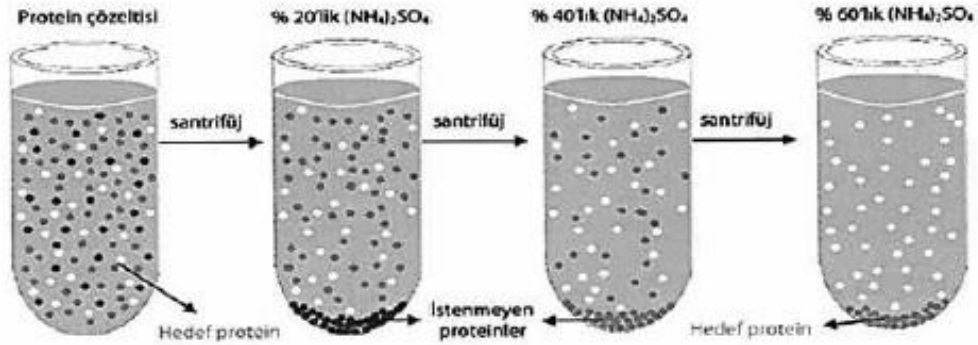
2.4.1. Santrifüjleme

Enzim saflaştırmada birçok aşamada santrifügasyon kullanılmaktadır. Genellikle hücre organellerinin ve büyük partiküllerin çöktürülmesi amacıyla kullanılır. Enzimin denatüre olmasının engellenmesi için bu işlemler genellikle +4 °C derecede yapılmaktadır [78].

2.4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi (Salting Out)

Salting out terimi tuzla çöktürme anlamına gelmektedir. Amonyum sülfat çöktürmesi proteinlerin çöktürülmesi için kullanılan bir yöntemdir ve yüksek bir ayırım gücüne sahip değildir. Çöktürme işleminde etkili olabilmesi için, çok değerlikli anyonlar ile tek değerlikli katyonların bir araya gelmesi önemlidir.

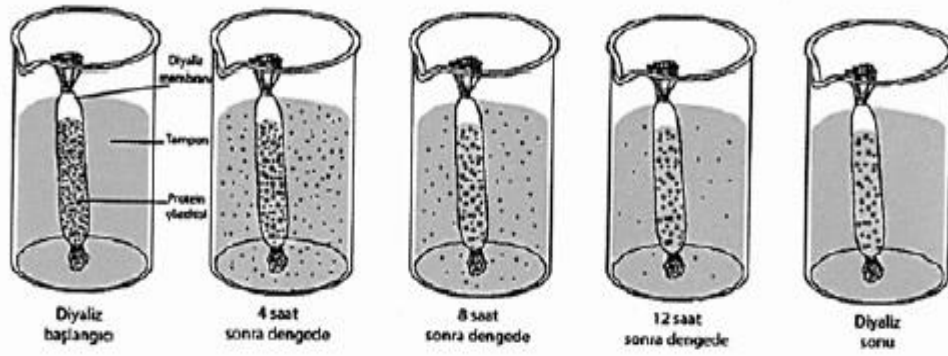
Amonyum sülfat tuzu, bu işlemi yapabilecek en ideal tuzdur. Amonyum sülfat çöktürmesinde, tuz konsantrasyonu arttıkça proteinin çözünürlüğü artmaktadır. Çeşitli hesaplamalarla ne kadar amonyum sülfat tuzu kullanılacağı hesaplanır ve ortama azar azar eklenen amonyum sülfat sonrasında istenmeyen proteinler çöktürme sayesinde uzaklaştırılır [79].



Şekil 2.4. Amonyum Sülfat Çöktürmesi [79]

2.4.3. Diyaliz

Tuz ile çöktürme sonrasında tuzdan ve diğer moleküllerden kurtulmak amacıyla kullanılan yöntemdir. Diyaliz tüpü, istenilen büyüklüklerde gözeneklere sahip olan yarı geçirgen bir ortamdır. Çeşitli biçimlerde hazırlanabilen diyaliz tüpü genellikle selülozik materyallerdir. Önce diyaliz tüpü sıcak suda temizlenir, ardından bir ucu bağlanarak süzülmesi istenen sıvı, içerisine eklenir ve diğer ucu kapatılır. Bu halde +4 °C derecede uygun tampon içerisine yerleştirilerek istenmeyen moleküllerin uzaklaşması sağlanmaktadır. Ozmotik basınçtan dolayı, tampon diyaliz tüpünün içine dolmaktadır bu sebeple tüpün ucu kapatılırken sıkı şekilde kapatılmamalıdır [79].



Şekil 2.5. Diyaliz aşamaları [79]

2.4.4. Kromatografi

Kromatografik yöntemler, saflaştırma işlemleri arasında, en sık kullanılan ve yüksek saflaştırma sağlayan yöntemlerdir. Bütün kromatografik ayrımlar, çözünenin hareketli ve sabit olmak üzere iki faz arasında ayrılmasıyla gerçekleşmektedir [96]. Kolon kromatografisinde; her iki ucunda adaptörleri bulunan camdan yapılmış bir tüp kullanılmaktadır. Bu kolonların içerisinde, iyon değiştirici reçineler kullanılmaktadır. Jel ayırma kromatografisi, molekülleri boyutlarına göre ayırır, çoğunlukla molekül ağırlık tayininde kullanılmaktadır [79].

İyon değiştirme kromatografisinde, kolon dolgusu yüklü gruplar bulundurur bu sayede nötralleşen protein çözeltisinde kolon dolgusu ile zıt yüklü proteinler kolona tutunurken, aynı yüklü proteinlerin kolonu önce terketmesiyle ayrılabilir. Bu İyon değişim kromatografisinde, genellikle selüloz reçineler tercih edilmektedir. DEAE (dietilaminoetil) genellikle anyon değiştirici olarak, CM (karboksimetil) ise katyon değiştirici olarak kullanılmaktadır [78,79].

2.4.5. Elektroforez

Elektroforez, proteinlerin görüntülenmesini sağlayan yöntemdir. Çözünmüş durumdaki moleküller, Akrilamid ve N-N Bisakrilamid ile polimerasyon sonucu oluşturulan jelde elektrik yüklerine bağlı olarak hareket etmektedirler [80,81].

Elektroforez yöntemiyle, proteinlerin molekül ağırlık tayini, izoelektrik noktası tayini ve saflık derecesi ölçümleri yapılabilmektedir [80].

Hazırlanan jel, elektroforez aygıtının içerisine yerleştirilir, ölçümü yapılacak olan örnekler ince bir bant halinde yüklenir. Elektriksel potansiyel ve jelin elek görevi görmesiyle, proteinler yük/kütle oranı ile hareketini gerçekleştirir. Jel üzerinde büyük moleküller yavaş hareket ederken, küçük moleküller hızlı hareket etmektedir [81].

2.4.6. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), protein ile SDS deterjan molekülünün etkileşmesini içermektedir. SDS ile kaynatılan proteinler denatüre olmaktadır. SDS'ler üzerindeki negatif yük, protein yükünü maskeler ve yüklenen tüm proteinler hemen hemen ayn yük/kütle oranında hareket ederler [79].

Yük farklılıkları SDS tarafından baskılandığı için, protein molekülleri boyut farklılıklarına göre birbirinden ayrılır ve bu metot sıklıkla molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılmaktadır [79]. Jel molekül ağırlığı bilinen proteinlerle standartize edilir, standart eğriden yararlanarak bilinmeyen proteinlerin molekül ağırlıkları hesaplanabilir [79].

2.5. Hedef Organizma Olarak Seçilen Depo Zararlısı Böcekler

2.5.1 *Galleria mellonella* (Büyük Balmumu Güvesi)

Galleria mellonella (büyük balmumu güvesi), arı kovanlarında petekler üzerinde yerleşir ve verim düşüşüne sebep olmaktadır [82]. *Lepidoptera* takımı, *Pyralidae* familyasına *Galleriinae* alt grubuna aittir [83].

G. mellonella erginleri kovanda herhangi bir hasara sebep olmazken, larvalar kovanda beslenerek, tüneller açıp peteklere hasar verirler [16].

G. mellonella yumurta, larva, pupa ve ergin olarak 4 ayrı yaşam evresinde gelişimini sürdürür. Yumurtalar, 0.478 mm ve 0.394 mm arasında değişir. Pembe, beyaz veya krem rengi olabilmektedir [16,83].

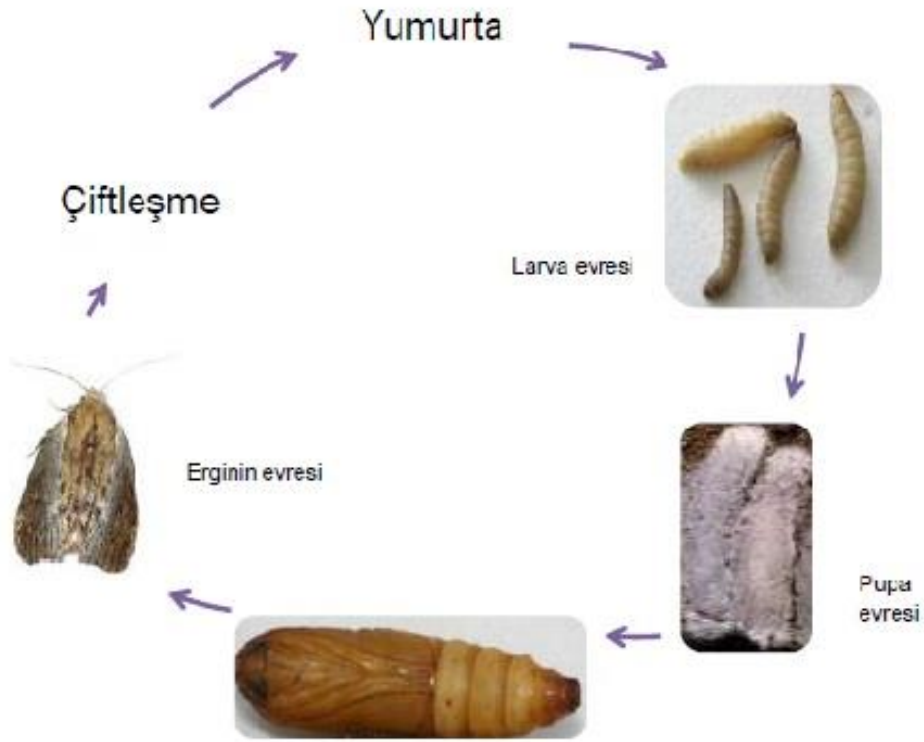
Larvalar, yumurtadan ilk çıktığında 1-3 mm arasında boya sahiptir. Larval dönem tamamlanırken genellikle 5-7 mm arasında bir büyüklüğe sahip olurlar. Kovanda en çok hasara sebep oldukları dönem, bu büyüme dönemidir [16,83].

Pupa evresinde, uzunlukları 12-20 mm arasında boyları değişir ve dişi *G. mellonella* pupaları genellikle daha uzun boyludur. Renkleri başlangıçta beyaz ve sarımsıdır, zamanla kahverengileşme görülür [16,83].

Ergin *G. mellonella*, dimorfizm gösterir, dişiler genellikle erkeklerden daha büyüktür. Her iki cinsiyetteki erginlerin de erginlik süresince beslenmedikleri bilinmektedir [84].

Sıcaklık ve bağıl nem gibi abiyotik faktörler tüm yaşam döngüleri için çok önemlidir. 29-33 °C arası gelişim için en uygun sıcaklık aralığıdır, %29-33 bağıl nem oranı ise en uygun nem aralığı olarak belirlenmiştir. Bu sebeple *G. mellonella* larva ve erginleri tropik ve subtropik iklimde yaşamlarını sürdürürler [83].

Kovanda işçi arıların az olduğu durumlarda, *G. mellonella* arıların kovayı terk etmesine ve ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır [16].



Şekil 2.6. *Galleria mellonella* yaşam döngüsü [16]

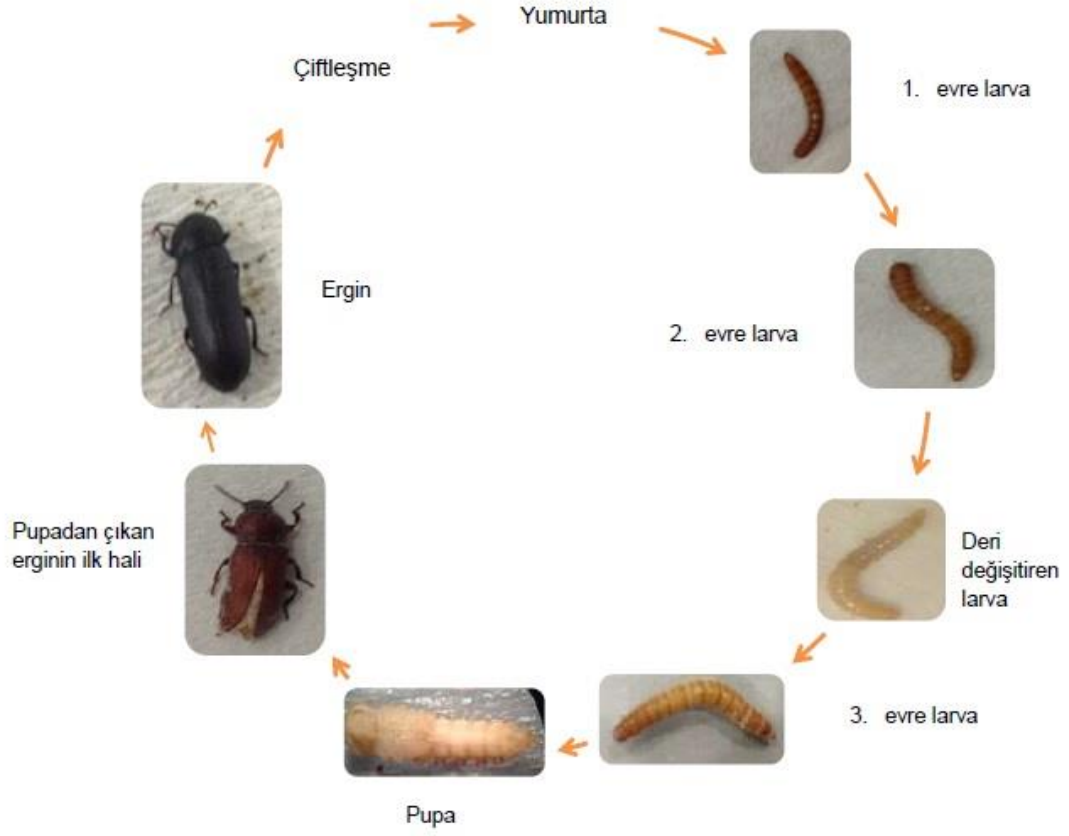
2.5.2 *Tenebrio molitor* (Un Kurdu)

Tenebrio molitor (un kurdu), sarı un kurdu olarak da bilinmektedir. *Coleoptera* takımında *Tenebrionidae* familyasında sınıflandırılmaktadır. Tahıllar ve un üzerinde beslenerek önemli bir depo zararlısı olduğu bilinmektedir [16].

Tenebrio molitor depolanmış ürünlerde zararlı olmasının yanı sıra, protein içeriği bakımından zengin önemli bir besin kaynağıdır ve hayvan yemi olarak, insan besini olarak da üretilmektedir [85].

Tenebrio molitor yumurtaları beyazdır, larvaları yumurtadan 3 mm uzunlukta çıkarlar, tahıllarla beslenip pupaya girmeden önce 25-35 mm arasında bir boya sahip olurlar. 4-6 gün arası süren bir pupa evreleri olur, pupa krem renklidir baş

kısmı geniş, kuyruğu sivri şekilde görünür. Ergin *Tenebrio molitor*, 2-3 ay yaşamaktadır, başlangıçta kahverengiyken daha sonra siyah görünüme sahip olur [16,86].



Şekil 2.7. *Tenebrio molitor* yaşam döngüsü [16]

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan *Beauveria bassiana* suşları Türkiye'den çeşitli lokalitelerden önceki çalışmalarda izole edilmiştir. [87] Türlerin moleküler analizleri Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalıyla ortak olarak yapılmıştır. [87,88,89]

3.2. Çalışmada Kullanılan Model Organizmaların Laboratuvar Koşulları Altında Üretimi

3.2.1. *Galleria mellonella*'nın Laboratuvar Koşulları Altında Üretimi

Çalışmada kullanılan *Galleria mellonella* larvaları ve erginleri laboratuvar ortamında hazırlanmış kavanozlar içindeki besiyerlerinde, 27°C sıcaklıkta ışısız ortamda üremeye bırakılmıştır. Yumurtadan çıkan larvalar 4. evredeyken, *Galleria* tuzak yöntemi kullanılarak elde edilen enzim üzerinde denenmiştir. *Galleria* tuzak yönteminde, larvaların 56°C'de 500 ml'lik su içinde 40 saniye bekletilerek pupaya girmeleri engellenmiştir [90].

3.2.2. *Tenebrio molitor*'un Laboratuvar Koşulları Altında Üretimi

Tenebrio molitor larvaları ve erginleri un-buğday kepeği içeren plastik kaplar içinde, 12 saat gündüz ve 12 saat gece döngüsü sağlanarak 24°C sıcaklıktaki iklim dolabında üretilmiştir. Böceğin su ihtiyacı, besiyeri içine konulan distile su ile ıslatılmış pamuklarla sağlanmıştır. Islak pamuklar 4-5 günde bir değiştirilmiştir [91].

3.3.Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

3.3.1. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

SDA (Sigma Aldrich), fungusların gelişiminde kullanılan genel üretim besiyeridir [92].

3.3.2. Sabouraud Dextrose Agar + Yeast Extract (SDAY)

Bu besiyeri SDA besiyerine %1 oranda Yeast Extract (maya ekstraktı) katılmasıyla tüplere hazırlanmıştır otoklavda 20 dk 120°C 1 atm basınçta steril edilmiştir. Fungusların spor solüsyonunun hazırlanmasında kullanılmıştır [1].

3.3.3. Basal Medium Besiyeri

Bu besiyeri seçilen suşların kitinaz üretim ortamı olarak denenmiştir.

İçeriğinde;

3 g KH_2PO_4 ,

1 g K_2HPO_4 ,

0.7 g MgSO_4 ,

1.4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

0.5 g NaCl,

0.5 g CaCl_2 ,

0.5 g maya ekstraktı,

0.5 g bakteriyel pepton,

5 g kitin,

1 litre distile su bulunmaktadır. 120°C ve 1 atm basınç altında 20 dakika otoklavda steril edilmiştir [93].

3.3.4. *Serratia* Medium Besiyeri

Bu besiyeri, seçilen suşların kitinaz üretim ortamı olarak denenmiştir.

15 g kitin,

0.5 g maya ekstraktı,

1.0 g (NH₄)₂SO₄,

0.3 g MgSO₄.7H₂O,

1.36 KH₂PO₄

1 lt distile suya eklenerek hazırlanmıştır. 120°C ve 1 atm basınç altında 20 dakika otoklavda steril edilmiştir [94].

3.3.5 Medium A Besiyeri

Bu besiyeri, seçilen suşların kitinaz üretim ortamı olarak denenmiştir.

10 g KNO₃,

5 g KH₂PO₄,

1.3 g MgSO₄,

20 mg FeCl₃,

3.5 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

0.4 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,

0.31 mg MnSO_4 ,

0.13 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,

0.5 g sukroz,

10 g kitin,

1 litre distile su kullanarak hazırlanmıştır. 120°C ve 1 atm basınç altında 20 dakika otoklavda steril edilmiştir [95].

3.3.6 Medium C Besiyeri

Bu besiyeri, seçilen suşların kitinaz üretim ortamı olarak denenmiştir.

5 g of laktoz,

1 g glukoz,

5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

15 g KH_2PO_4 ,

0.6 g MgSO_4 ,

0.6 g CaCl_2 ,

5 mg $\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

1.6 mg MnSO_4 ,

1.4 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

2 mg CoCl_2 , ve

10 g kitin, 1 litre distile su [95].

3.3.7 Kobalt Medium Besiyeri

Bu besiyeri, seçilen suşların kitinaz üretim ortamı olarak denenmiştir.

Medium C besiyeri modifiye edilerek hazırlanmıştır.

4 g laktoz,

0,8 g glukoz,

4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

12 g KH_2PO_4 ,

0.480 g MgSO_4 ,

0.480 g CaCl_2 ,

0,400 g $\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

1.120 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

0.040 g CoCl_2 , ve

8 g kitin,

1 litre distile su kullanılarak hazırlanmıştır. 120°C ve 1 atm basınç altında 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3.3.8 Karides Kabuklu Besiyeri

Karides kabuklu besiyeri, seçilen suşların kitini hidroliz edip etmediğini tespit etmek amacıyla SDA besiyerine öncelikle %5 oranda kitin eklenmesiyle, 120°C' de

1 atm basınçta 20 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır. 50 farklı *Beauveria bassiana* suşu bu besiyerlerine ekilmiştir. Petriler 28°C'de 7 gün inkübe edilmiştir.

Ardından üreme görülen besiyerlerinden alınan bir parça, SDA besiyeri ortasına yerleştirilmiştir. Besiyerinden alınan parçanın etrafına daire şeklinde steril karides kabukları serpilmiştir [96].

3.3.9 Kolloidal Kitinli Besiyeri

Bu besiyeri enzim sentezleyen suşların belirlenmesi için kullanılmıştır.

%1 kolloidal kitin, %0,2 maya ekstraktı, %2 agar kullanılarak 120°C ve 1 atm basınçta 20 dakika otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır [97].

3.3.10 *Galleria melonella* Üretim Besiyeri

660 g buğday kepeği, 660 g buğday unu, 330 g süt tozu, 165 g toz maya, 525 g bal peteği, 330 g bal, 330 ml gliserin eklenerek *Galleria melonella* larvalarının beslenmesi için kavanozlara hava boşluğu bırakılacak şekilde eklenmiştir [1,16].

3.3.11 Tween 80

SDAY besiyerine ekilen fungus suşlarının, spor solüsyonlarının hazırlanmasında Tween 80(Sigma-Aldrich) solüsyonu kullanılmıştır. [16]

3.3.12 Çalışmada Kullanılan Tamponlar

Tris-HCl tamponu pH (8.8- 6,8), elektroforezde kullanılmıştır. [81]

Sodyum-fosfat tamponu pH (5.6), indirgen şeker tayini ölçülmesinde kullanılmıştır. [2]

Sitrat tamponu pH (5.0), N-Asetil Glukozamin standart eğrisinin hazırlanmasında kullanılmıştır. [48]

3.4. Kolloidal Kitinin Hazırlanması

Kolloidal kitin hazırlanması için, 10 g kitin, 120 ml %85'lik oligofosforik asite (H_3PO_4) eklenerek +4°C'de 1 gece bekletilmiştir. Ertesi gün bulamaç haline gelen karışım, Whatmann No:1 kağıdı ile filtre edilmiştir. Distile su ile yıkanarak asitten arındırılmıştır. Bulamaç halindeki kitin, kuruduktan sonra filtre kağıdından alınarak distile su içerisinde çözülüp +4 derecede saklanmıştır [98].

3.5. DNS (Bernfield Reaktifinin Hazırlanması)

Etrafı alüminyum folyo ile sarılı bir erlenmayerde,

1,0 g DNS,

0,2 g Fenol,

0,05 g Na_2SO_3 ,

20 g Na-K Tartarat,

1,0 g NaOH

Karıştırılıp, 100 ml distile su eklenmiştir. Karışım 24 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır [99]. DNS çözeltisi, +4°C'de kullanılmak üzere saklanmıştır. Çözelti bekledikçe renk verme etkinliğini yitirdiğinden, ölçümlerden önce taze olarak hazırlanmıştır.

3.6. Alkalin Çözeltisinin Hazırlanması

%4' lük Na₂CO₃, %4' lük Na-K tartarat, %2' lik CuSO₄ çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmıştır.

Bir beher içinde, manyetik karıştırıcıda

100 ml %4' lük Na₂CO₃,

1 ml %4' lük Na-K tartarat

1ml %2' lik CuSO₄ karıştırılmıştır.

Hazırlanan alkalin çözeltisi, protein miktar tayinlerinde kullanılmıştır [116].

3.7. Çalışmada Kullanılan *B. bassiana* Suşlarının Çoğaltılması

Çalışmada kullanılan *Beauveria bassiana* fungus izolatları, SDA (Sabouraud-Dextrose Agar) besiyerine ekilmiş, 4 gün 28°C 'de inkübasyona bırakılmıştır.

3.7.1 Spor Solüsyonunun Hazırlanması

Seçilen *B. bassiana* izolatları, tüplere hazırlanan SDA besiyerine ekilmiş 14 gün 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Spor solüsyonu hazırlanırken, besiyerlerine %1'lik Tween 80 bulunan 15 ml distile su eklenmiştir [16,101]. Steril öze yardımı ile sporların su içerisine geçmesi sağlanmıştır. Spor solüsyonlarının hazır hale

gelmesi için, 1 dakika boyunca en yüksek devirde vorteks işlemi gerçekleştirilmiştir [102].

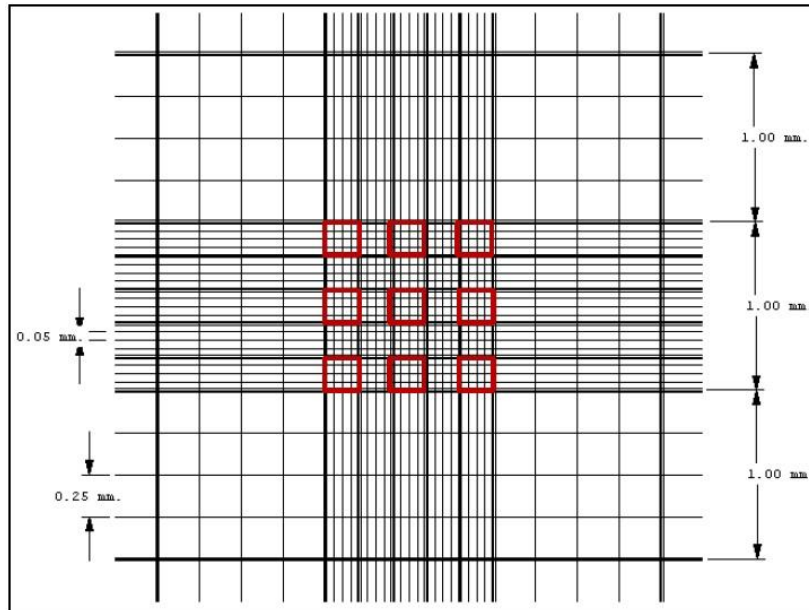
3.7.2 Spor Sayısının Belirlenmesi

Hazırlanan *B. bassiana* suşlarının spor sayımı için Improved Neubauer lamı kullanılmıştır. Örnek, 100 µl Neubauer lamı üzerine boşaltılmış, bir lamel ile lamın üzeri kapatılıp mikroskop altında sayım yapılmıştır. Spor sayımında Improved Neubauer lamının ortasında yer alan 25 kareden, 0,004 mm³ hacimli 9 kare seçilmiş ve sayım yapılmıştır. 9 kare içerisindeki spor sayısı 0,036 ile bölünerek 1 µl'deki spor sayısı bulunmuş 1000 ile çarparak 1ml spor sayısına ulaşılmıştır [16,103].

9 karedeki toplam spor sayısı

1 ml'deki spor sayısı = ----- x 1000

0.036



Şekil 3.1. Neubauer lamı sayım alanı [103]

3.8. Kitinaz Üreten Suşların Saptanması

Karides kabuklu besiyeri ve koloidal kitinli besiyeri üzerine *B. bassiana* suşları ekimleri yapılmıştır. Kitinaz aktivitesi fiziksel olarak (karides kabukları üzerinde üreme ve besiyerinde açılma zonu oluşumu) görülen suşlar ile çalışmaya devam edilmiştir.

3.8.1. Kitinaz Enzimi Üretimi İçin Uygun Besiyerinin Seçimi

Entomopatojen funguslar için önceki çalışmalarda kitinaz enzimi eldesinde kullanılan besiyerleri (Basal Medium, Serratia Medium, Medium A, Medium C) enzim üretim ortamı olarak denenmiştir [93,94,95].

Medium C besiyeri modifiye edilerek enzim üretim ortamı için Kobalt Medium besiyeri oluşturulmuştur. 250 ml'lik erlenlere eklenen 100 ml sıvı Kobalt Medium besiyeri içine, 1000 µl spor solüsyonu eklenmiş 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Bu besiyerleri üzerinde 24 saatte bir ölçüm yapılmıştır, en yüksek aktivite gösteren besiyeri temel besiyeri olarak seçilmiştir.

3.9. Kaba Enzim Ekstraktı

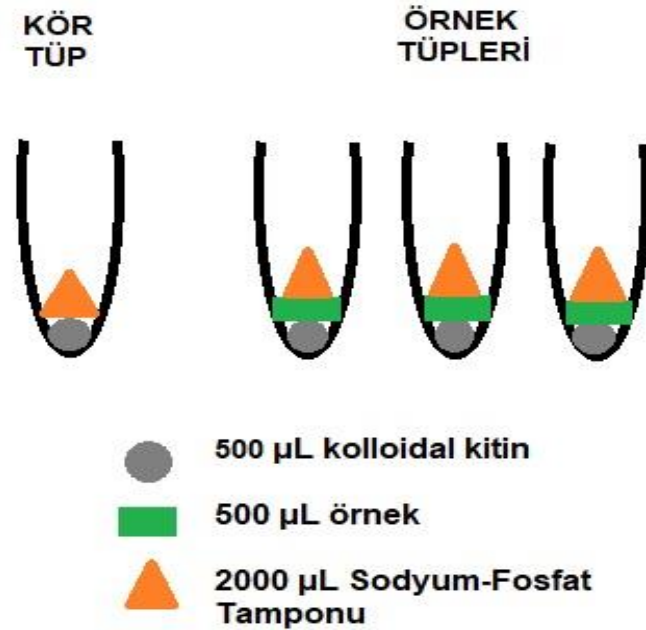
250 ml' lik erlenlerde hazırlanan ve 28°C'de inkübasyona bırakılan örnekler, Whatmann No:1 filtre kağıdından süzülerek, +4°C'de 4000 g'de 40 dk santrifüj edilmiştir [2]. Elde edilen süpernatant, kaba enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır [2,48].

3.9.1. DNS Yöntemiyle İndirgen Şeker Tayini (Aktivite Ölçümü)

DNS yöntemiyle şeker tayini aşağıda verilen sıra ile yapılmıştır.

1. Örnek tüplerine 500 µL %1 kolloidal kitin (3.4. başlıkta anlatıldığı gibi hazırlanan) substrat olarak eklendi.
2. Üzerine 500 µL örnek eklendi. 2000 µL sodyum fosfat tamponu eklendi. Kör tüpe ise kolloidal kitin ve 2500 µL sodyum fosfat tamponu (pH 5.6) eklendi.
3. Tüpler, 50 °C'deki su banyosunda 30 dakika bekletildi.
4. Su banyosundan çıkarılan tüplerin oda sıcaklığına gelmesi bekledi.
5. Bütün tüplere 3 mL DNS çözeltisi eklendi.
6. Tüpler 10 dakika kaynar su banyosunda bekletildi.
7. Spektrofotometrede 575 nm'de kör çözeltiliye göre örnek absorbansları okundu.

Örneklerdeki indirgen şeker miktarını bulmak için örnek çözeltilerinin absorbansları, N-asetilglukozamin standart eğrisi üzerinden hesaplandı. Örneklerdeki N-asetilglukozamin miktarı mg/mL olarak bulundu [48,99].



Şekil 3.2. Kör ve Örnek Tüplerinin Hazırlanması

3.10. Örneklerdeki Protein Miktarı Tayini

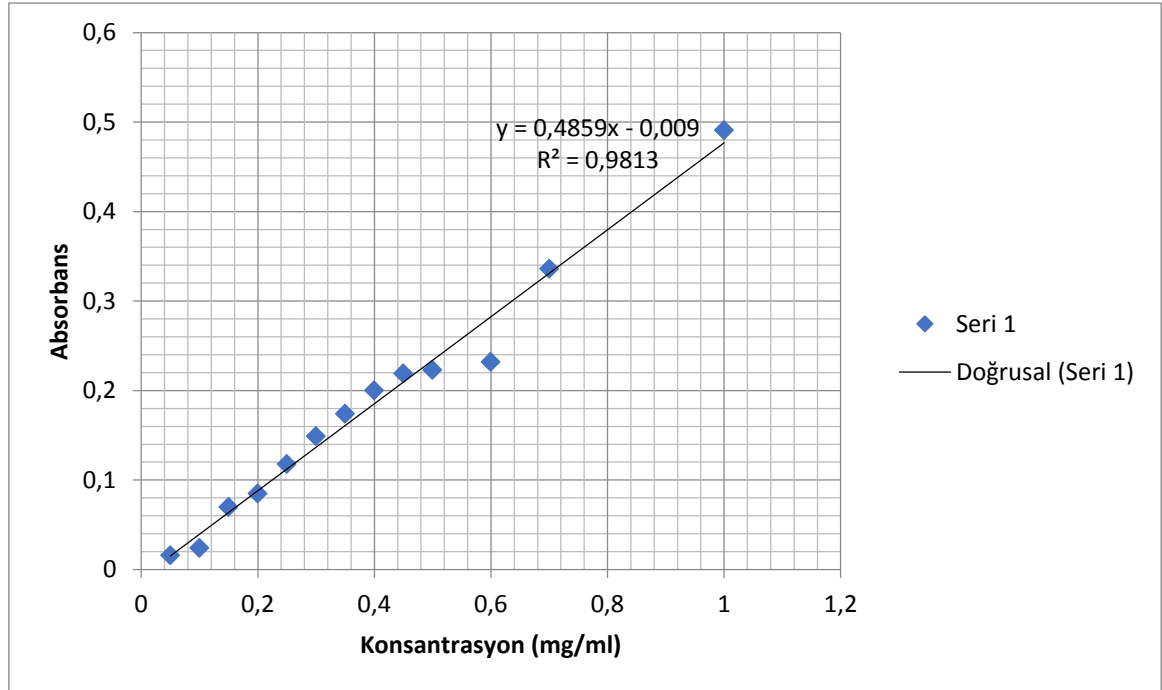
Örneklerdeki protein miktar tayini Lowry yöntemine göre yapılmıştır [100].

Tüplere 5 ml alkalın çözeltisi, 400 µl saf su ve 50 µl enzim ilave edilmiştir. 40°C'de 15 dk su banyosunda bekletilen örneklerin üzerine %50 oranında saf su ile seyreltilmiş 500 µl Folin Reaktifi (FCR) ilave edilip, 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. 600 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Standart eğrinin çizilmesi için Bovine Serum Albumin (BSA) çözeltisi kullanılmıştır. BSA standart eğrisi çizilerek, örneklerdeki protein miktarı hesaplanmıştır [100].

Çizilen standart eğrinin regresyon denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

$$y = 0,4859x - 0,009$$

$$R^2 = 0,9813$$



Şekil 3.3. Total Protein Standart Eğrisi

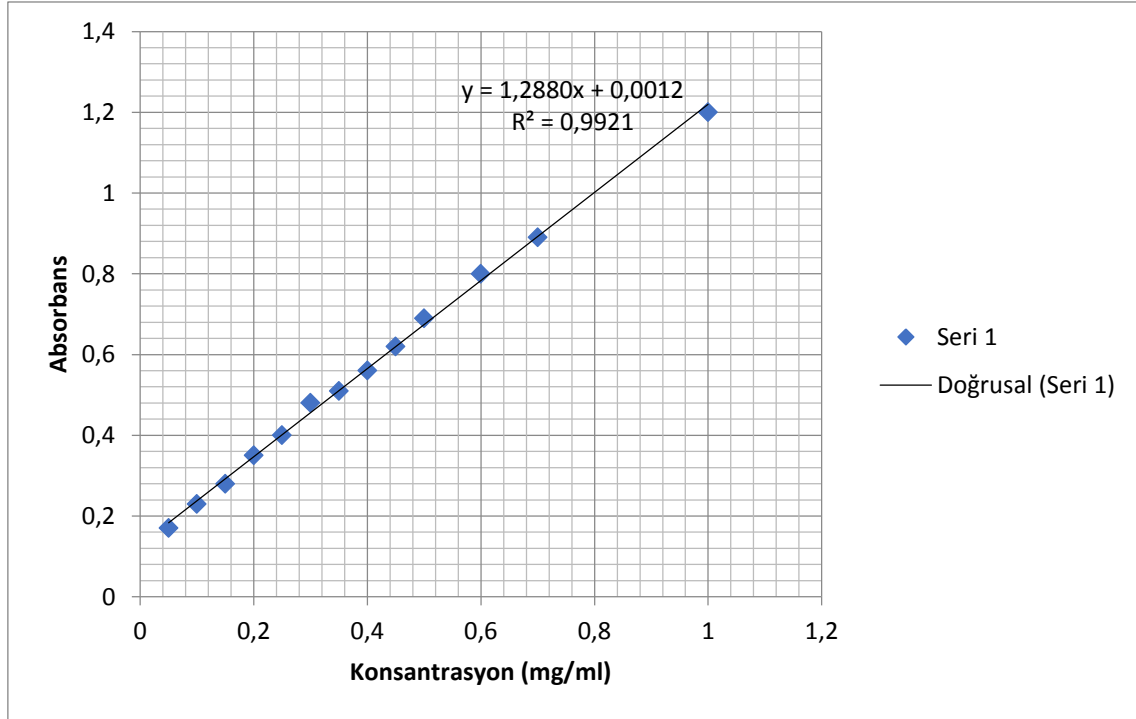
3.11. Örneklerdeki N-Asetil Glukozamin Miktarı Tayini

Örneklerdeki N-Asetil Glukozamin (GlcNAc) miktarını belirlemek için, sitrat çözeltisi içerisinde %1'lik GlcNAc çözeltisi hazırlanarak bir standart grafik çıkarılmıştır.

DNS metoduyla çözeltinin 575 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Absorbans ve N-Asetil Glukozamin miktarları arasında standart eğri çizilmiştir. [48]

Eğrinin regresyon denklemi aşağıdaki gibi bulunmuştur.

$$y = 1,2880x + 0,0012$$



Şekil 3.4. N-Asetil Glukozamin Standart Eğrisi

3.12. Total Ünitenin Hesaplanması

Total Ünite (U/mL) = [(mg indirgen şeker / mL x 1000) / (t x MG)]

Total Ünite yukarıdaki formüle, standart eğrilerden bulunan değerler eklenerek hesaplanmaktadır [48].

mg indirgen şeker/ml: Örneklerin ve boş denemelerin absorbanları arasındaki farka karşılık gelen indirgen şeker miktarı

t: İnkübasyon zamanı (30 dakika)

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

3.13. Enzim Spesifik Aktivitesinin Hesaplanması

Birimi U/mg'dır. Total ünitenin, mL'deki protein miktarına bölünmesi ile spesifik aktivite hesaplanmıştır [48].

3.14. Kitinaz Enzimi Üretimi Üzerine Farklı Parametrelerin İncelenmesi

3.14.1. Optimum İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

Enzimin optimum inkübasyon süresinin belirlenebilmesi için seçilen besiyerleri 250 ml erlenlere 100 ml olarak koyuldu. Üzerine 1000 µl spor solüsyonu eklenerek 28°C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. Her bir saat denemesi 3 tekrarlı olarak yapıldı. Her 24 saatte bir, aktivite DNS (Bernfield Reaktifi) ile ölçülerek en uygun inkübasyon süresi tespit edilmiştir. (24 saat- 240 saat arasında)

3.14.2. Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Enzimin sentezlendiği optimum inkübasyon süresinin belirlenebilmesi için, Kobalt Medium Besiyerine, 1000 µl spor solüsyonu eklenerek, 20°C, 28°C, 40°C, 50°C, 60°C sıcaklıklarında çalkalamalı etüvde optimum süreye göre inkübasyona bırakılmıştır. Her sıcaklık derecesi için enzim aktivitesi tayini yapılarak optimum inkübasyon sıcaklığı tespit edilmiştir. Her bir sıcaklık denemesi, 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.14.3. Besiyerinde Optimum pH Aralığının Belirlenmesi

Enzimin sentezlendiği optimum pH aralığının belirlenebilmesi için, Kobalt Medium Besiyerine, 1000 µl spor solüsyonu eklenerek, pH 2.00, 2.50, 3.00, 3.50, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00, 10.00 aralıklarında çalkalamalı etüvde optimum süreye göre inkübasyona bırakılmıştır. Her pH derecesi için enzim aktivite tayini yapılarak optimum pH aralığı belirlenmiştir. Her bir pH denemesi, 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.14.4. En Uygun İnokülüm Miktarının Belirlenmesi

Enzimin en yüksek aktiviteyle sentezlendiği optimum inokülüm miktarının belirlenebilmesi için 250 µl, 500 µl, 1000 µl, 2000 µl spor solüsyonları, 250 ml'lik erlenlere eklenen 100 ml besiyerlerine ilave edilmiştir. Bu besiyerleri, 28°C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inokülüm miktarı için 3 tekrar yapılmış, en uygun inokülüm miktarının belirlenmesi için enzim aktivitesi tayini yapılmıştır.

3.14.5. Enzim Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla, enzim substratla muamele edildiği sırada inkübasyon sıcaklıkları değiştirilerek 30°C, 50°C, 70°C, 90°C sıcaklıklarda 3 tekrarlı olarak denenmiştir. Ardından enzim aktivitesi ölçümü yapılmış, kitinaz enzim aktivitesinin optimum olduğu sıcaklık belirlenmiştir.

3.15. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Proteinlerin istenilen oranda çöktürülmesi için %70 oranında amonyum sülfat derişimi kullanılmıştır. Bu oran standart amonyum sülfat doygunluk tablosundan çekilmiştir. Belirlenen amonyum sülfat miktarı, sürekli ve yavaş yavaş karıştırılarak buz içerisinde kaba enzim çözeltisi üzerine eklenmiştir. Tuz ilavesi bittikten sonra, 10-60 dakika karıştırmaya devam edilmiştir. 6.000 x g'de 15 dakika santrifüjlenerek üst sıvı atılmıştır. Çökelti, kendi hacminin 1-2 katı sodyum-fosfat tamponunda çözülmüştür. Ortamdaki amonyum sülfat diyaliz membran yöntemi ile uzaklaştırılmıştır [2,79, 104].

3.16. Diyaliz Membran

Tuz çöktürmesinden sonra enzimde bulunan tuzdan ve istenmeyen diğer küçük moleküllerden uzaklaştırmak için yapılmıştır. Öncelikle diyaliz membranının (Sigma Aldrich, 10 kDa) temizlenmesi için çeşitli işlemler yapılmıştır.

1. %0,3 Sodyum Sülfat çözeltisinde 80°C'de 1 dk bekletilmiştir. 60°C'de sıcak distile suda 2 dk bekleterek yıkanmıştır. Ardından %0,2'lik Sülfirik Asit içerisinde 1 dk bekletilmiştir. Tekrar 60°C'de sıcak distile suda 2 dk yıkanmıştır.

2. Hazırlanan diyaliz torbasının bir ucu ip ile bağlanarak diyaliz torbası haline getirilmiştir, içerisine amonyum sülfat çöktürmesi uygulanan enzim ekstraksiyonu koyulmuştur. Diğer ucu da ip ile bağlanmıştır.
3. İki ucu bağlı diyaliz torbası, 500 ml beher içerisine enzimin çözdürüldüğü tampon olan sodyum-fosfat tamponu eklenerek bekletilmiştir. 8 saatte bir tampon yenilenerek, toplamda 24 saat bekletilmiştir. Difüzyon sebebiyle diyaliz torbası bu sırada şişmiştir.

Diyalizin temizleme yöntemi, diyaliz kutusu üzerinde yazan tarife göre yapılmıştır. (Sigma Aldrich)

3.17. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi için DEAE Sephacel™ (Sigma Aldrich), sıvı şeklinde satılan hazır kolon kullanılmıştır. DEAE Sephacel™, (25 cm'lik) ince steril edilmiş kolona musluğu kapatılarak yavaşça boşaltılmış ve donması beklenmiştir. DEAE Sephacel kolonu başlangıç tamponu ile yıkanarak, diyaliz edilmiş enzim içeriğinin DEAE-selüloz üzerine adsorbe olması sağlanmış, kolondan alınması için 2N ve 1N NaCl içeren 50 mM pH=6.8 tris tamponu kullanılarak elüe edilmiştir. [105]

3.18. Elektroforez

3.18.1. Nondenatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi

1.5 M Tris. HCl pH 8,8: 54,45 g Tris base (Sigma) 150 ml distile su içinde çözdürülerek çözeltinin pH' ı 1N HCl ile pH 8,8' e ayarlanmıştır. Son hacim distile su ile 300 ml'ye tamamlanarak, çözelti filtre edilmiştir. Hazırlanan tampon çözelti +4°C'de saklanmıştır.

0.5 M Tris. HCl pH 6,8: 6 g Tris base 60 ml distile su içerisinde çözdürülerek, çözeltinin pH' ı 1N HCl ile pH 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacim distile su ile 100 ml'

ye tamamlanarak, çözelti filtre edilmiştir. Hazırlanan tampon çözelti +4°C'de saklanmıştır.

Akrilamid / bis akrilamid: 28,8 g akrilamid, 1,2 g bis akrilamid distile su ile 100 ml' ye tamamlanarak, çözelti filtre edilmiştir. Hazırlanan karışım +4 °C'de saklanmıştır.

%10'luk APS (Amonyumpersülfat): 0,1 g APS distile su ile 1 ml' ye tamamlanarak, taze olarak hazırlanmıştır.

Elektroforez tamponu: 3 g Tris, 14,4 g glisin, 0,1 g SDS' e 1000 ml distile su ilave edilerek hazırlanmış ve +4°C'de saklanmıştır.

İz boya (Örnek boya): 7 ml 0,1M pH 6.8' deki Tris-HCl tamponu, 3,6 ml gliserol, 1,2 mg Brom Fenol Mavisi'nden oluşan karışıma 10 ml distile su ilave edilmiştir. Boya homojen bir karışım haline geldikten sonra, 1' er ml olacak şekilde ependorflara konarak -80 °C'de saklanmıştır.

%10'luk SDS: 0,1 g SDS distile su ile 1 ml' ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Coomassie Brilliant Blue boyası: 1 gr Coomassie Brilliant Blue, 372 ml distile su, 125 ml metanol ve 50 ml asetik asit kullanılarak hazırlanmıştır.

Jelden boyayı geri alma solüsyonu: 372 ml saf su, 125 ml metanol ve 50 ml asetik asit kullanılarak hazırlanmıştır [81,106].

3.18.2. Yükleme Jelinin Hazırlanması

6,9 ml saf suya, 1,7 ml Akrilamid/bis akrilamid, 10 µl %10'luk SDS, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8), 100 µL %10'luk APS karıştırılmıştır. APS eklendikten sonra karışıma en son 6 µl TEMED eklenmiştir. Jel buz içerisinde ve sürekli magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak gerçekleştirilmiştir [81,106].

3.18.3. Ayırma Jeli Hazırlanması

3,3 ml saf su, 4 ml Akrilamid/bis akrilamid, 2,5 ml 1,5 M Tris. HCl (pH 8.8), 100 µl %10'luk SDS, 100 µl %10'luk APS karıştırılmıştır. APS eklendikten sonra karışıma en son 6 µl TEMED eklenmiştir. Jel buz içerisinde ve sürekli magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada mini jel elektroforezi kullanılmıştır. İki cam levha arasına, ilk olarak hazırlanan ayırma jeli dökülmüştür, daha sonra üzerine su ile doyurulmuş izopropanol eklenerek jelin hava ile olan teması kesilmiştir. Ayırma jeli oda sıcaklığında 30-45 dakika polimerizasyona bırakılmıştır. Polimerizasyon gerçekleştiikten sonra, jel üzerindeki izopropanol dökülerek, jel iki kere distile su ile yıkanmıştır. Polimerize olmuş ayırma jeli üzerine hazırlanan yükleme jeli dökülerek kuyucukların oluşması için tarak yerleştirilmiştir. Hava ile temasını kesmek ve daha düzgün bir jel yüzeyi elde etmek için, jelin üzerine izopropanol dökülerek jel oda sıcaklığında 1 saat polimerizasyona bırakılmıştır [81, 106].

3.18.4. Örneklerin Jel Üzerine Yüklmesi

Moleküler ağırlıkları bilinen ticari standart protein markerlarından 20 µl alınıp, üzerine 15 µl iz boya eklenmiştir. Kaba enzim ekstraktı ve diyaliz sonrası enzim ekstraktı ve kolon kromatografisi işlemlerinden geçmiş enzim ekstraktından 40 µl alınıp üzerine 15 µl iz boya eklenmiştir.

Örnekler kuyucuklara sırasıyla konulmuştur. 1.00 mm'lik jele 250V (40 mA) akım verilerek, yaklaşık 2 saat sonra elektroforez işlemi tamamlanmıştır. Camlar arasındaki jel çıkarıldıktan sonra; enzim ekstraktları yüklenmiş jel 1 saat 0,1 M Tris. HCl (pH 8)' de 37 °C' de bekletilmiştir. Ardından jel üzerine Coomassie Brilliant Blue boya solüsyonu dökülmüştür. Boyayla birlikte jel +4°C'de 3 saat bekletildikten sonra dökülerek, boyanın fazlası distile su ile alınmıştır. Bu işlemler jele zarar vermeden çok narin şekilde yapılmıştır. Daha sonra jel üzerine boya çıkarma solüsyonu eklenerek, 3 saatte bir solüsyon değiştirilerek bekletilmiştir. Bu işlem bantlar belirgin hale gelene kadar devam etmiştir, jel daha sonra incelemeye alınmıştır [81].

3.18.5. Moleküler Ağırlık Hesaplaması

SDS-PAGE işlemi sonunda, jel üzerinde işaret (iz) boyanın aldığı yol ve standart protein bantlarının yürüdüğü mesafe cetvel yardımıyla ölçülerek, Rf (Rölatif göç hızı) değerleri hesaplanmıştır. Standart proteinlerin Rf değerleri apsise (x eksen) ve molekül ağırlıklarının log10 değerleri ordinata (y eksen) yazılarak, standart bir grafik hazırlanmıştır. Hazırlanan bu standart grafiğin yardımıyla *Beauveria bassiana*'dan elde edilen kitinaz enziminin molekül ağırlığı hesaplanmıştır [106].

3.19. Elde Edilen Enzim Ekstraktlarının Hedef Organizmalar Üzerinde Denenmesi

3.19.1. Ekstraktların *Galleria mellonella* (Büyük Balmumu Güvesi) Larvaları Üzerinde Denenmesi

Püskürtme yönteminde, kaba enzim ekstraktı (kısmi saflaştırılmış) ve kolon kromatografisinden elde edilmiş olan enzim ekstraktı, kurutma kağıdı yerleştirilmiş petrilere, her petriye 5'er tane inaktive edilmiş larva koyularak, *Galleria mellonella* larvaları üzerine 1ml eklenmiştir. Kontrol grubu için %1'lik Tween 80 ve distile su eklenmiştir. 27°C'de karanlık etüvde her gün gözlenmiştir [107]. Nemi sağlamak için gerektiğinde petrilere 1 ml distile su ilave edilmiştir. Her aşama 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Püskürtme yöntemi dışında, hedef organizmalar üzerinde daldırma yöntemi de denenmiştir. Bu yöntemde de petrilere içinde kurutma kağıtları bulunmaktadır. İnaktive edilmiş *Galleria mellonella* larvaları, kısmi saflaştırılmış enzim ve kolon kromatografisinden elde edilmiş olan enzim ekstraktları içine steril penset yardımıyla 5 saniye daldırılıp, petrilere içine 5'er tane bırakılmıştır [108]. Kontrol grubu için %1'lik Tween 80 ve distile su karışımı kullanılmıştır. Her aşama 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.19.2. Ekstraktların *Tenebrio molitor* (Un Kurdu) Larvaları Üzerinde Denenmesi

Püskürtme yönteminde, kaba enzim ekstraktı ve kolon kromatografisinden elde edilmiş olan enzim ekstraktı, kurutma kağıdı yerleştirilmiş petrilere, her petriye 5'er tane larva koyularak, *Tenebrio molitor* larvaları üzerine 1ml eklenmiştir. Kontrol grubu için %1'lik Tween 80 ve distile su eklenmiştir. 25°C'de 12 saat gece 12 saat gündüz döngüsü sağlanarak her gün gözlenmiştir [107]. Nemi sağlamak için gerektiğinde petrilere 1 ml distile su ilave edilmiştir. Her aşama 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Püskürtme yöntemi dışında hedef organizmalar üzerinde daldırma yöntemi de denenmiştir. Bu yöntemde de petriler içinde kurutma kağıtları bulunmaktadır. *Tenebrio molitor* larvaları, kaba enzim ekstraktı ve kolon kromatografisinden elde edilmiş olan enzim ekstraktı içine steril penset yardımıyla 5 saniye daldırılıp, petriler içine 5'er tane bırakılmıştır [108]. Kontrol grubu için %1'lik Tween 80 ve distile su karışımı kullanılmıştır. 25°C'de 12 saat gece 12 saat gündüz döngüsü sağlanarak her gün gözlenmiştir. Her aşama 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.20. İstatistiksel Yöntemler

Beauveria bassiana fungusunun enziminin kaba enzim ekstraktının ve kolon kromatografisi sonrası ekstraktın saflaştırma aşamalarında ölçümler spektrofotometre ile yapılmış ve kaydedilmiştir. Çeşitli parametreler denenerek yapılan ölçümlere tek yönlü ANOVA ve LSD (Least Significant Difference: en düşük anlamlı farklılık) testleri uygulanmıştır.

Kaba enzim ekstraktı ve kolon kromatografisiyle ileri saflaştırılmış enzim örnekleri *G. mellonella* ve *T. molitor* larvaları üzerinde 3 tekrarlı olarak denenmiş, veriler kaydedilmiştir. Deneyde elde edilen veriler üzerine Kruskal-Wallis ve Mann Whitney U testleri uygulanmış, kontrol grubu ve birbirleri ile olan fark, analiz edilmiştir. LT50 değerleri hesaplanmasında IBM SPSS Statistics-23 programında Probit Analiz testi kullanılmıştır.

4.SONUÇLAR

4.1. *Beauveria bassiana* İzolatlarının Çoğaltılması

Daha önceki çalışmalarda [16,87,88,89] Türkiye’den çeşitli lokalitelerden izole edilen *Beauveria bassiana* suşları, SDA agara ekim yapılarak çoğaltılmış, spor solüsyonları hazırlanması için SDAY besiyeri kullanılmıştır.



Şekil 4.1. *Beauveria bassiana* izolatlarının çoğaltılması

4.2. *Beauveria bassiana* Suşlarının Spor Sayımlarının Yapılması

Beauveria bassiana suşları SDA ve SDAY besiyerlerinde üretilmiştir. Neubauer lamıyla yapılan sayım sonucunda 1×10^8 kon/ml ve üzerinde konsantrasyonu olan spor solüsyonu elde edilmiştir. Spor sayımlarının ardından spor sayısı yüksek olan suşlarla çalışmaya devam edilmiştir. Bu suşlar; Lül-1, BY8, BY9, Rize, Bb19, Man2, Ank1, Ank-12, L-1, Rize suşlarıdır.

4.3. Katı Besiyeri Ortamında Kitin Kullanımının Tespiti

Hazırlanan karides kabuklu besiyeri ve kolloidal kitinli katı besiyerleri üzerine Türkiye’den çeşitli lokalitelerden izole edilen *B. bassiana* suşlarının ekimi yapılmış

ve karides kabukları üzerinde üreme gösteren suşlar, koloidal kitinli besiyerine ekilmiştir.

Kolloidal kitinli besiyerinde, kitinaz enzimini en iyi sentezleyen izolatlar şeffaf zonlar oluşturmuştur.

Bu şekilde çalışmanın başında 50 tane olan suşlar arasından en iyi 10 suş belirlenmiş, çalışmaya onlarla devam edilmiştir. Bu suşlar; Lül-1, KVL 03129, BY8, BY9, L-1, Man2, Bb19, Rize, Ank-1, Ank-12 suşları olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Karides kabuklu besiyerinde kitin kullanımı tespiti



Şekil 4.3. Kolloidal kitinli besiyerinde kitinaz enzimine bağlı açılma zonları

4.4. Kaba Enzim Ekstraktı

250 ml' lik erlenlerde hazırlanan ve 28°C'de inkübasyona bırakılan örnekler, Whatmann No:1 filtre kağıdından süzülerek, +4°C'de 4000 g'de 40 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant, kaba enzim ekstraktının enzim aktivitesi tayini için kullanılmıştır.



Şekil 4.4. Kaba Enzim Ekstraktı

4.5. Enzim Aktivitesi Ölçümü için Substrat Hazırlanması

Enzim aktivitesi ölçümü için koloidal kitin substrat olarak belirlenmiş ve Selitrennikoff metoduna göre hazırlanmıştır. Ölçümde kullanılmak üzere hazırlanan koloidal kitin aktivite ölçümlerinde %0,1 lik çözelti olarak kullanılmıştır.

4.6. Enzim Üretim Ortamı Olarak Denenen Sıvı Besiyeri Ortamları

Enzim üretimi için denenen sıvı besiyeri ortamları Basal Medium, Serratia Medium, Medium A besiyeri, Medium C besiyeridir. Bu besiyerlerine 1000 µl *B. bassiana* spor solüsyonlarından ekim yapılmış, 28°C'de çalkalamalı etüvde 10 gün boyunca üremeye bırakılmış, her gün spektrofotometrede ölçümleri yapılmış fakat enzim aktivitesi çok düşük miktarlarda bulunmuştur. Aralarından en yüksek aktivite değerleri Medium C besiyerinde bulunmuştur. Medium C besiyerinin modifiye edilmesiyle yeni bir besiyeri Kobalt Medium Besiyeri oluşturulmuş ve 10 günlük

ölçümde aktivite değerleri istenilen düzeyde olduğundan çalışmaya Kobalt Medium Besiyeri ile devam edilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.



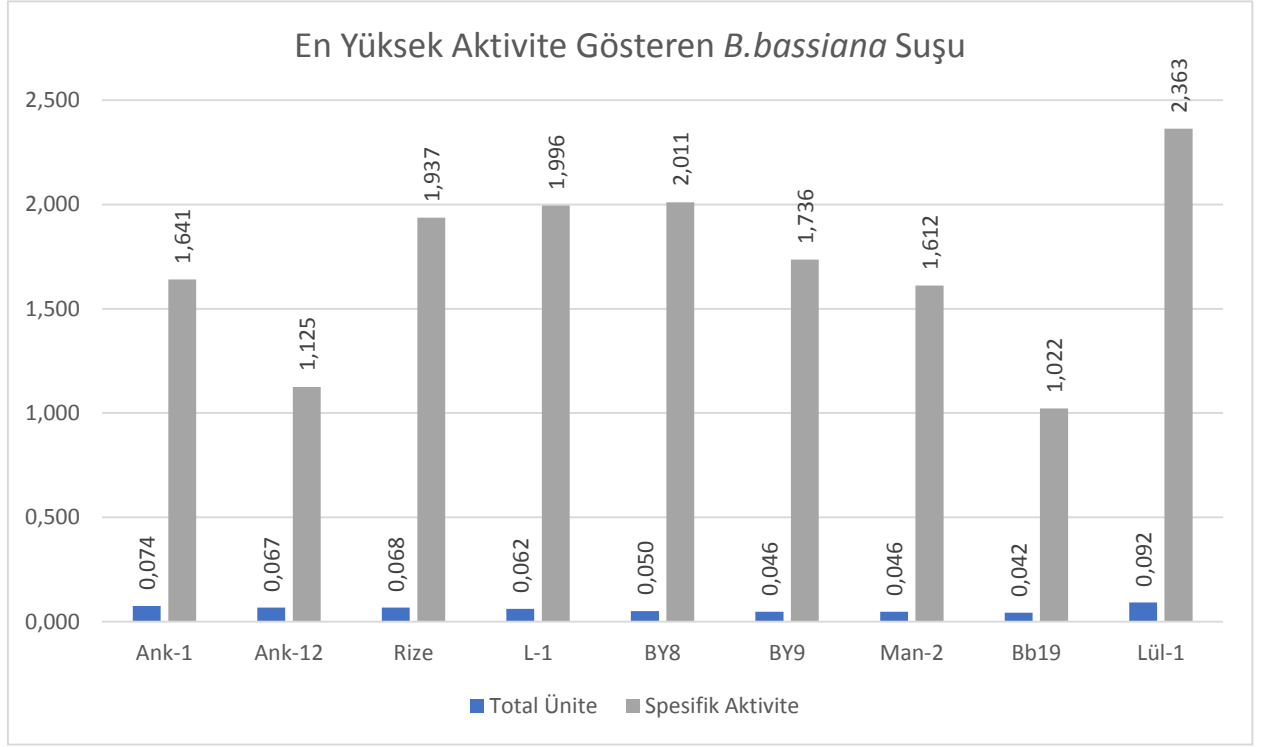
Şekil 4.5. Enzim üretim ortamı olarak denenen sıvı besiyerleri

4.7. En Yüksek Enzim Aktivitesi Gösteren *Beauveria bassiana* İzolatının Belirlenmesi

Çalışmaya 50 farklı *B. bassiana* suşuyla başlanmış, aktivitelerinin yetersiz olmasıyla bir kısmı çeşitli aşamalarda elenmiştir. Elimizde aktivitesinin yüksek olduğu tahmin edilen suşlar Lül-1, BY8, BY9, Bb19, Man2, Ank1, Ank-12, L-1, Rize suşlarıydı. Her bir suştan 3 tekrarlı olmak üzere, enzim üretim ortamına 1 ml spor solüsyonu eklenmiş, 24 saatte bir aktivite ölçümleri yapılmıştır. Bunlarla yapılan ölçümler sonucunda en iyi aktivite gösteren Lül-1 suşuyla çalışmalara devam edilmiştir.

Çalışılan suşlar arasında LSD testine göre tüm suşlar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. ($p < 0,05$) Karşılaştırmalarda en yüksek aktivitenin görüldüğü 3.gün değerleri kullanılmıştır.

Ortalamalar arasında en büyük farklılık Bb19 ile Lül-1 arasında bulunmuştur.



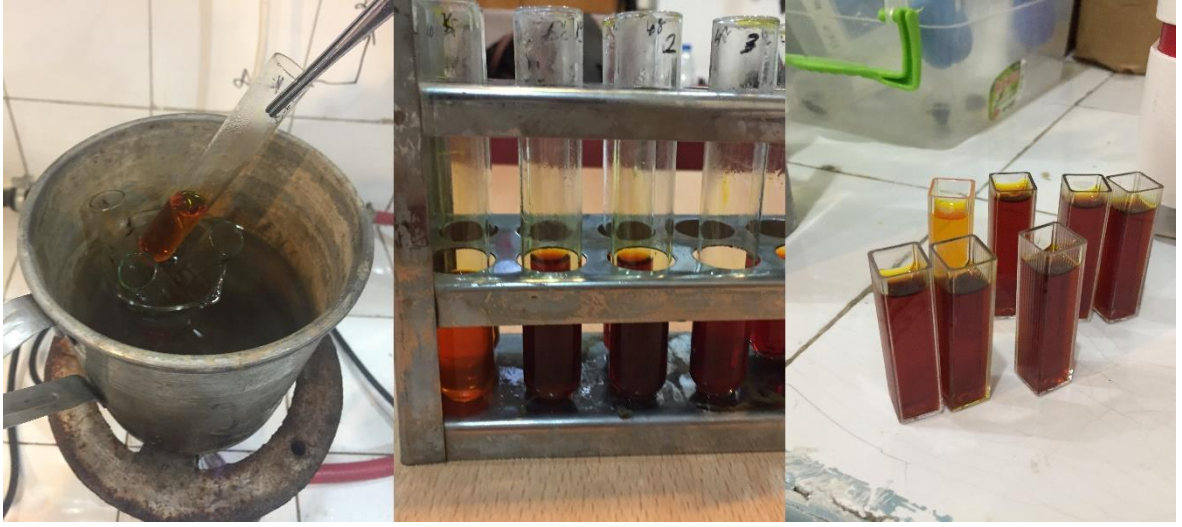
Şekil 4.6. *Beauveria bassiana* izolatlarının enzim aktivitesi

Çizelge 4.1. *Beauveria bassiana* izolatlarının en yüksek enzim aktivitesi gösteren Lül-1 suşuna göre ortalama fark ve standart hataları

Lül-1	Suşlar	Ortalama Fark (U/mg)	Standart Hata
Lül-1	Ank-1	4,011	0,201
Lül-1	Ank-12	3,815	0,201
Lül-1	Rize	3,294	0,201
Lül-1	L-1	2,928	0,201
Lül-1	BY8	3,512	0,201
Lül-1	BY9	4,171	0,201
Lül-1	Man-2	4,122	0,201
Lül-1	Bb-19	4,434	0,201

4.8. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Enzim aktivitesi için başlangıçta en yüksek aktivitenin olduğu gün belirlenmesi amacıyla 10 gün boyunca her 24 saatte bir ölçülmüştür. İnkübasyondan sonra 0,5 ml süpernatant (enzim) ve 0,5 ml %0,5' lik koloidal kitine, 2 ml fosfat tamponu (pH 5.6) eklenerek, 1 saat 50 °C'deki su banyosunda inkübe edilmiştir. Daha sonra karışıma 3 ml DNS boyası eklenerek 10 dk kaynar suda inkübe edilmiştir. Renklenen örnekler 575 nm' de spektrofotometrede ölçülmüştür.



Şekil 4.7. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

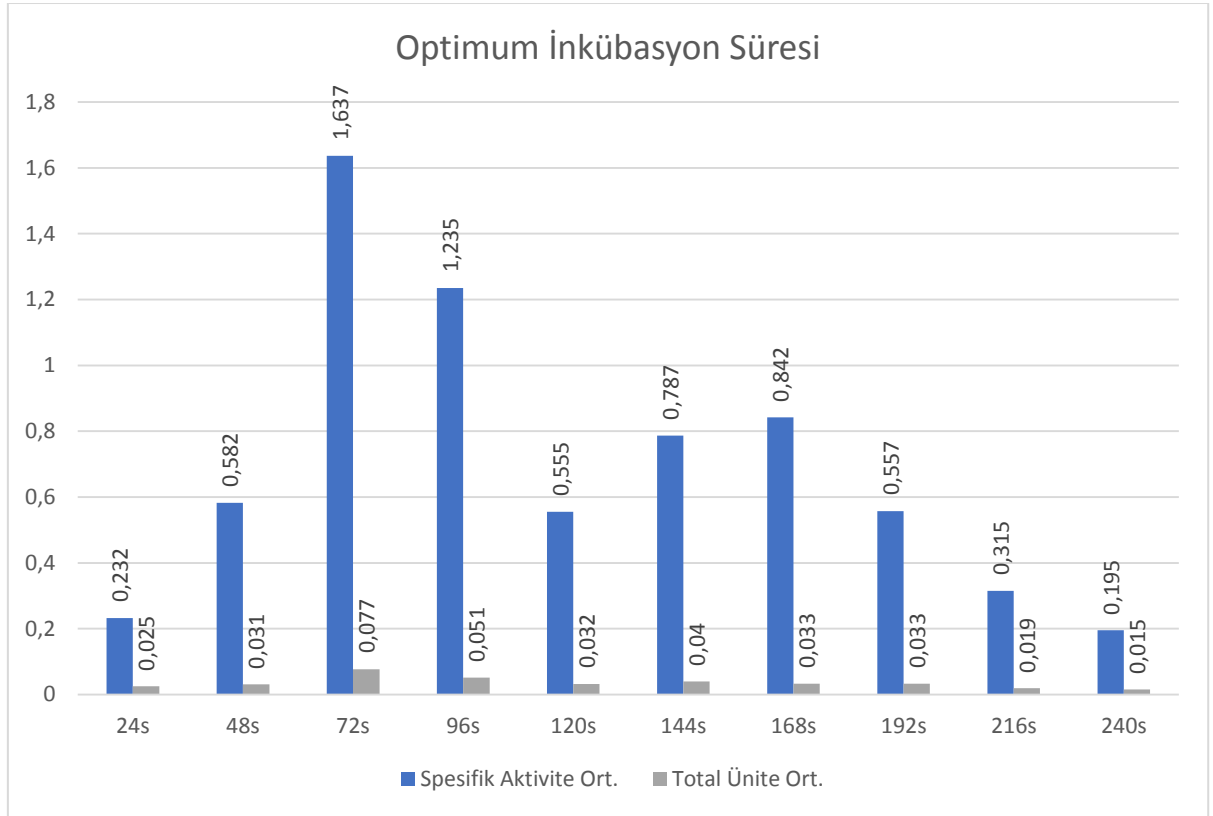
Enzim aktivitesi, protein miktarı ölçümleriyle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Protein miktarı tayini Lowry yöntemine göre yapılmıştır.

N-asetilglukozamin standart eğrisi kullanılarak bulunan indirgen şeker miktarı belirlenmiş, protein miktarı da BSA eğrisi standart alınarak hesaplanmıştır. Daha sonra çıkarılan denklem üzerinden enzim total ünitesi ve spesifik aktivitesi hesaplanmıştır.

Lül-1 suşunun en yüksek aktivite gösterdiği zaman 72.saat (3.gün) olarak belirlenmiştir.

Çalışılan gün süreleri arasında LSD testine göre, en yüksek aktivitenin olduğu 3. gün ile tüm günler arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. ($p < 0,05$)

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek aktivitenin görüldüğü gün olan 3. Gün pozitif kontrol grubu olarak belirlenmiş, kontrol grubu ile en yüksek farklılığın olduğu gün 10. Gün olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8. İnkübasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.2. Çalışılan inkübasyon sıcaklıkları ile kontrol grubu arasındaki ortalama fark ve standart hata

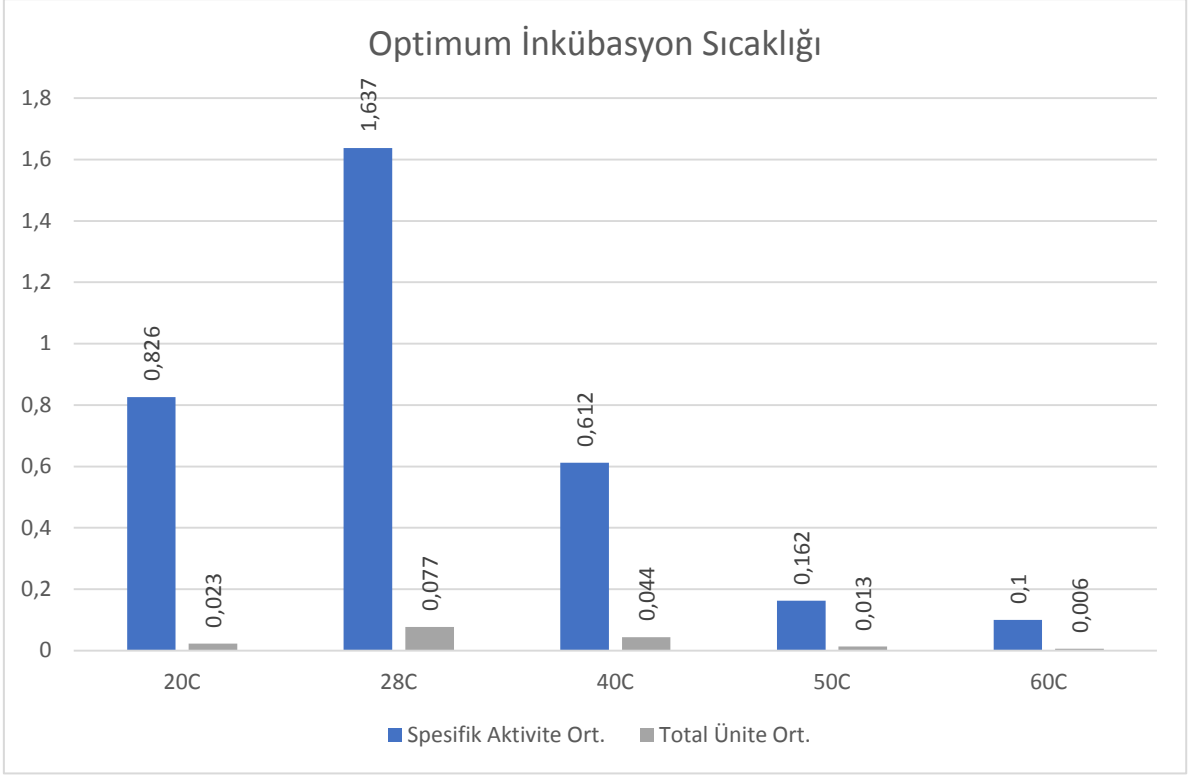
Pozitif Kontrol	Saatler	Ortalama Fark (U/mg)	Standart Hata
72.saat	24.saat	10,717	0,058
72.saat	48.saat	9,560	0,058
72.saat	96.saat	5,449	0,058
72.saat	120.saat	9,273	0,058
72.saat	144.saat	7,774	0,058
72.saat	168.saat	9,096	0,058
72.saat	192.saat	9,027	0,058
72.saat	216.saat	12,079	0,058
72.saat	240.saat	12,924	0,058

4.9. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Üretim Ortamı Sıcaklık Değerinin Saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için çeşitli sıcaklıklarda (20°C, 28°C, 40°C, 50°C, 60°C) 72 saat (3 gün) çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Enzim geniş bir sıcaklık aralığında aktivite göstermiş olup, optimum sıcaklık *Beauveria bassiana* için de optimum üreme sıcaklığı olan 28°C olarak belirlenmiştir. En düşük aktivite 60°C'de bulunmuştur, 28°C'den sonra aktivitede düşüş gözlenmiştir.

Deneylerde kontrol grubu, aktivitenin en iyi gözlendiği 28°C olarak seçilmiştir. Çalışılan sıcaklıklar ile pozitif kontrol grubu arasında LSD testine göre anlamlı farklılık bulunmuştur. ($p < 0,05$)

En düşük aktiviteye 60°C'de rastlanmış, pozitif kontrol grubu ile en büyük fark da 60°C'de tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. İnkübasyon sıcaklığının enzim aktivitesine etkisi

Çizelge 4.3. Çeşitli inkübasyon sıcaklıklarının en yüksek aktivite gösteren 28°C sıcaklığına göre ortalama fark ve standart hataları

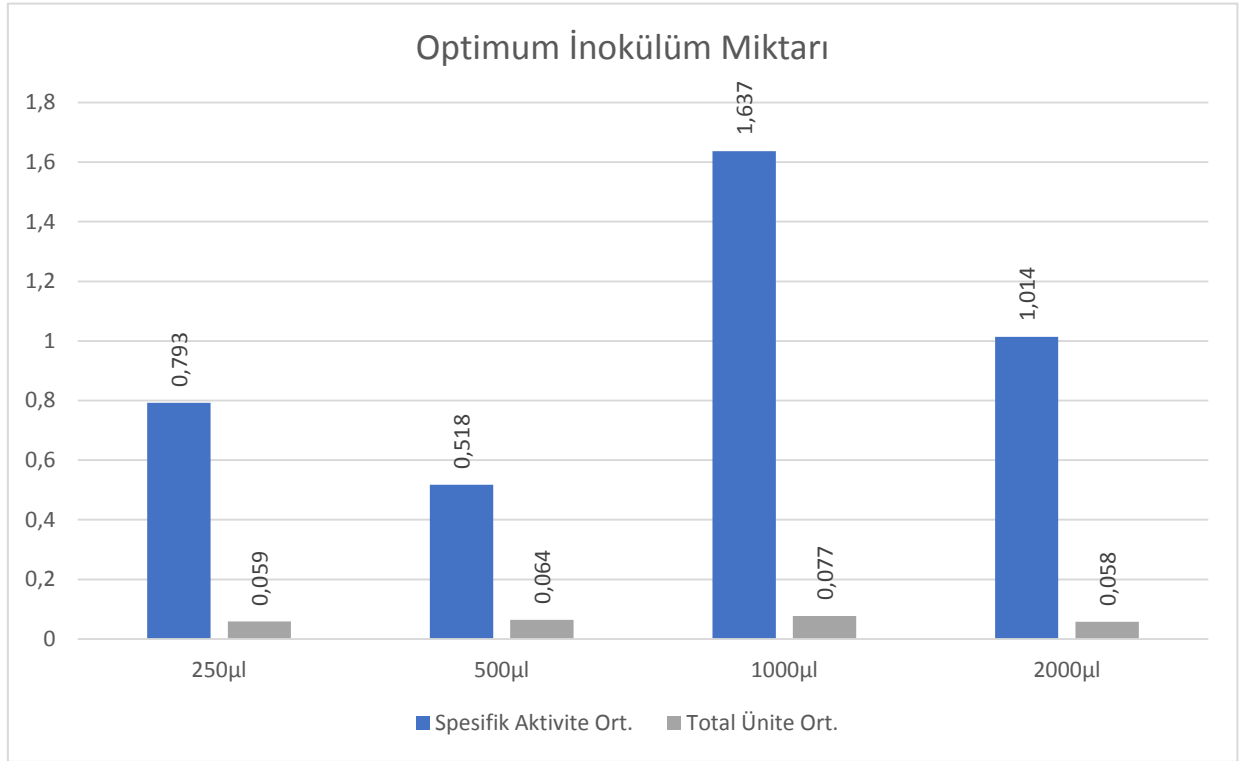
Kontrol	Sıcaklıklar	Ortalama Fark (U/mg)	Standart Hata
28°C	20°C	9,757	0,091
28°C	40°C	10,486	0,091
28°C	50°C	12,797	0,091
28°C	60°C	13,386	0,091

4.10. Enzimim Sentezlenmesi İçin İdeal İnokülüm Miktarının Belirlenmesi

Enzim aktivitesinde uygun inokülüm miktarını belirlemek amacıyla besiyerine sırasıyla 250 µl, 500 µl, 1000 µl, 2000 µl spor solüsyonu eklenmiştir, inkübasyon sonrasında aktiviteleri ölçülmüş protein miktarlarına göre spesifik enzim aktiviteleri

belirlenmiştir. 250 ml erlenlere koyulan 100 ml sıvı besiyeri ortamına en iyi aktivite 1000 µl spor solüsyonu eklenerek elde edilmiştir, 1000 µl kontrol grubu olarak belirlenmiştir.

Çalışılan inokülümlemler ile kontrol grubu arasında LSD testine göre anlamlı farklılık bulunmuştur. ($p < 0,05$)



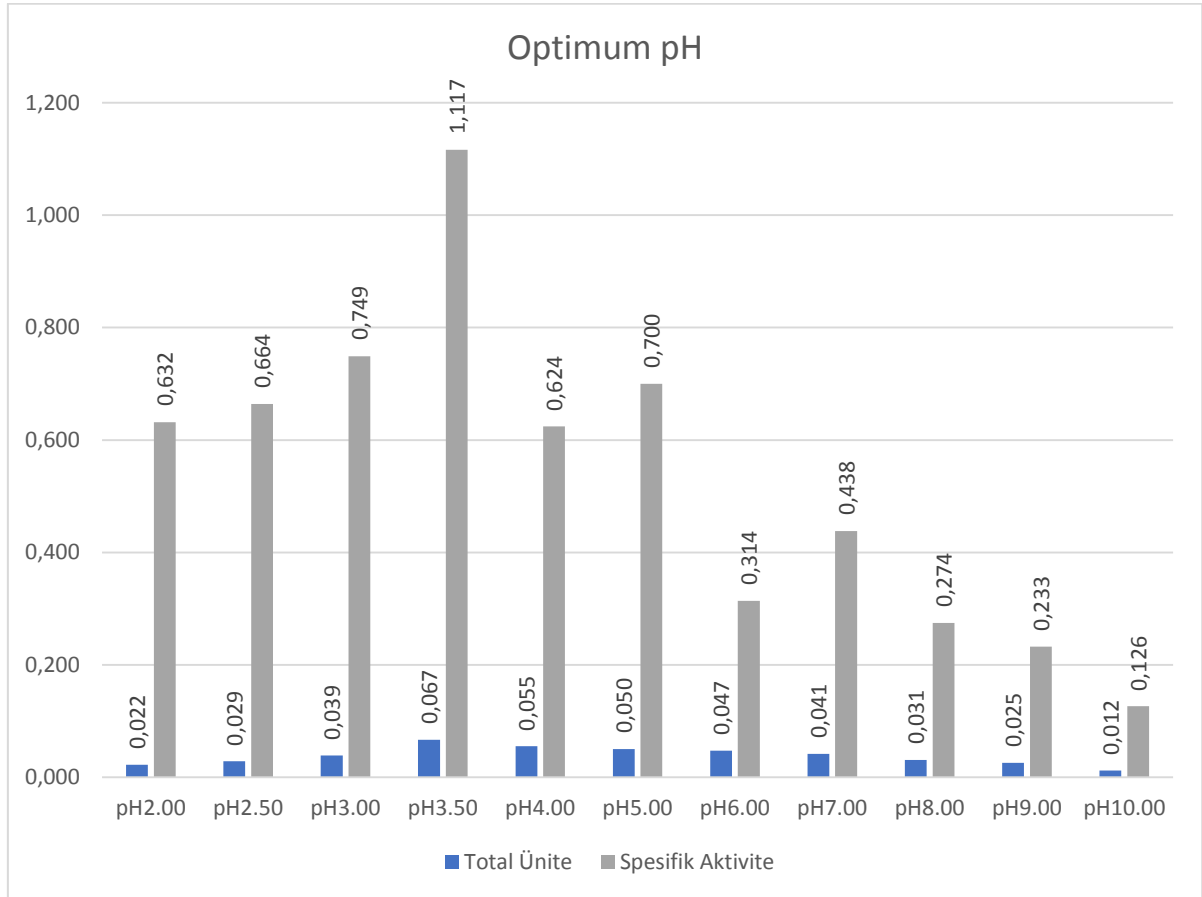
Şekil 4.10. İnokülüm miktarının enzim aktivitesine etkisi

Çizelge 4.4.Çeşitli inokülüm miktarlarının en yüksek aktivite gösteren 1000 µl inokülüm miktarına göre ortalama fark ve standart hataları

Kontrol	İnokülüm	Ortalama Fark(U/mg)	Standart Hata
1000µl	250µl	2,946	0,075
1000µl	500µl	2,154	0,075
1000µl	2000µl	3,009	0,075

4.11. Enzimin Sentezi için Uygun pH Değerinin Saptanması

Enzimin optimum pH'ının belirlenmesi için çeşitli pH'larda besiyeri hazırlanıp, 72 saat (3 gün) 28°C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Enzimin çok geniş bir pH aralığında aktivitesinin devam ettiği gözlenmiş, en iyi aktivite gösterdiği pH 3.50 olarak belirlenmiştir. pH 3.50 pozitif kontrol grubu olarak belirlenmiş ve diğer pH'lar ile arasında LSD testine göre anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir. ($p < 0,05$)



Şekil 4.11. Çeşitli pH derecelerinin enzim sentezine etkisi

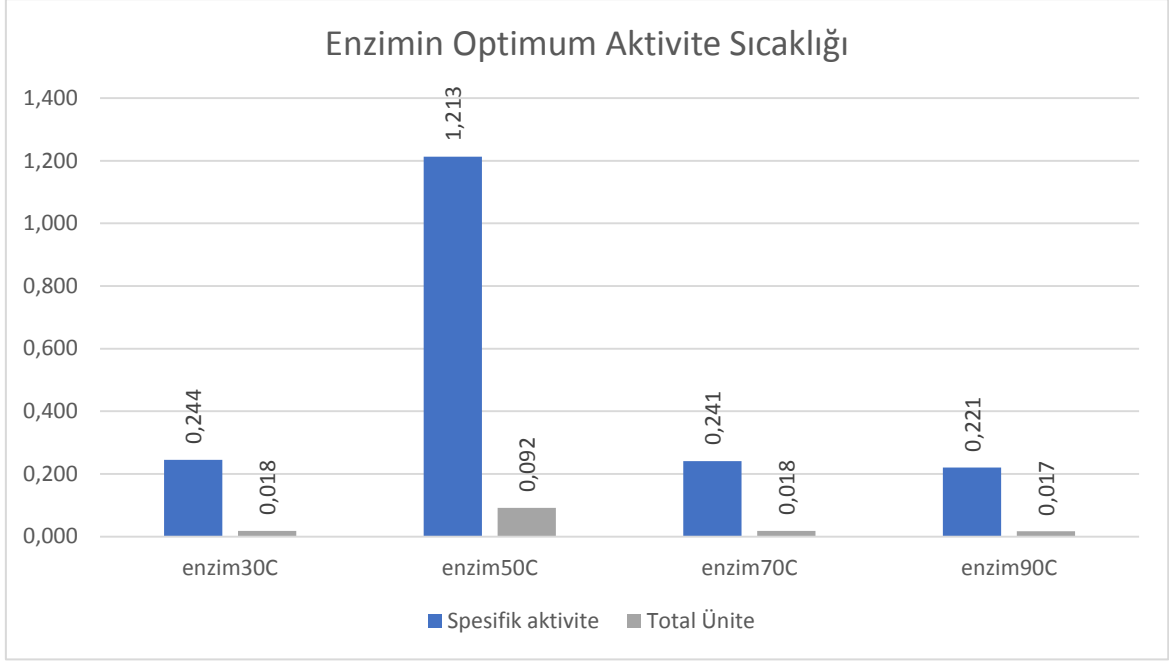
Çizelge 4.5. Çeşitli pH derecelerinin en yüksek aktivite gösteren pH 3.50 derecesine göre ortalama fark ve standart hataları

Kontrol	pH	Ortalama Fark (U/mg)	Standart Hata
pH3.50	pH2.00	6,436	0,183
pH3.50	pH2.50	5,959	0,183
pH3.50	pH3.00	5,555	0,183
pH3.50	pH4.00	4,560	0,183
pH3.50	pH5.00	5,439	0,183
pH3.50	pH6.00	5,485	0,183
pH3.50	pH7.00	5,532	0,183
pH3.50	pH8.00	6,053	0,183
pH3.50	pH9.00	6,229	0,183
pH3.50	pH10.00	6,697	0,183

4.12. Enzim Aktivitesine Bekletme Sıcaklığının Etkisinin Saptanması

Enzim eldesi aşamalarında, inkübasyon sonrası Whatmann No:1 ile süzöldükten sonra, substratla birleştirilmektedir. Substrat ve tampon ile birleştikten sonra enzimin ortaya çıkması için 1 saat inkübasyona bırakılmaktadır. Bu inkübasyon sıcaklıklarının enzim aktivitesini anlamak amacıyla, sıcaklıklar değiştirilip spesifik aktivite tayini yapılmıştır. Enzimin en yüksek aktivitesi 50°C'de 1 saat bekletilmesiyle bulunmuştur.

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği bekletme sıcaklığı 50°C pozitif kontrol olarak belirlenmiş ve LSD testine göre diğer sıcaklıklarla arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. ($p < 0,05$)



Şekil 4.12. Çeşitli bekletme sıcaklıklarının enzim aktivitesine etkisi

Çizelge 4.6. Çeşitli bekletme sıcaklıklarının en yüksek aktivite gösteren 50°C sıcaklığına göre ortalama fark ve standart hataları

Kontrol	Sıcaklık	Ortalama Fark(U/mg)	Standart Hata
50°C	30°C	4,803	0,151
50°C	70°C	5,276	0,151
50°C	90°C	6,212	0,151

4.13. Safılaştırma İşlemleri Sonrası Aktivite Karşılaştırılması

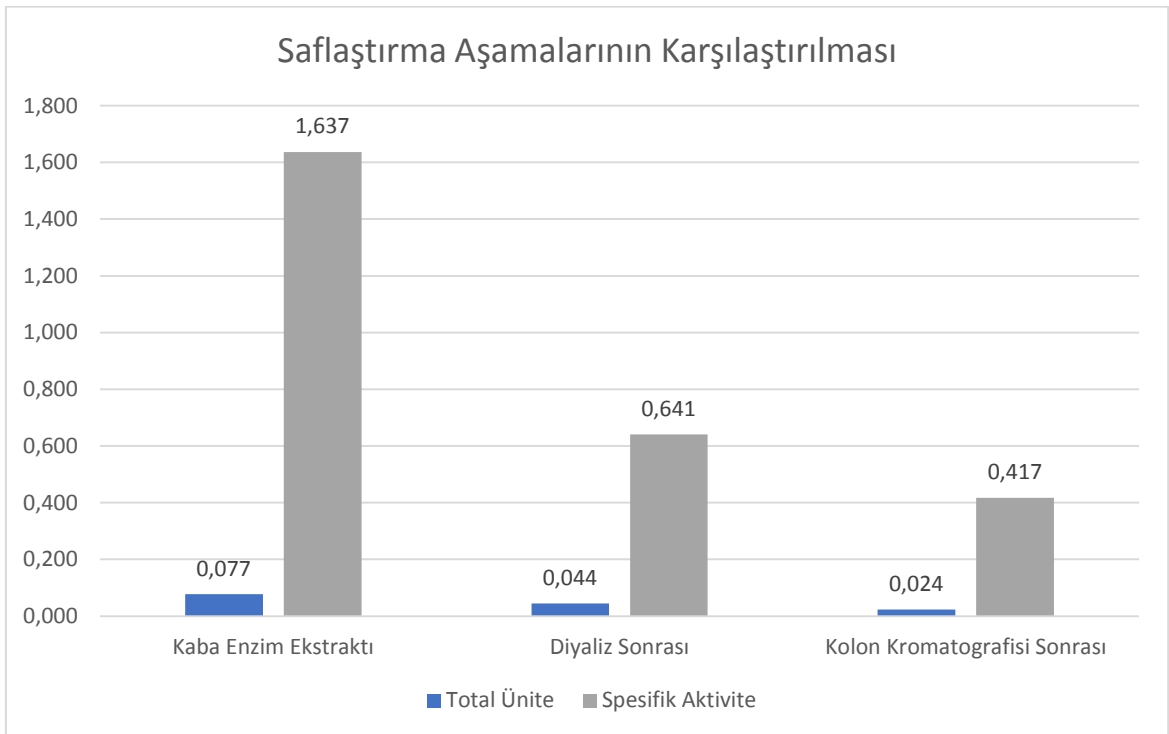
4.13.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi Sonundaki Enzim Aktivitesi

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinden sonra DNS indirgen şeker yöntemiyle spektrofotometrede 575 nm'de enzim aktivitesi ölçülmüştür. Protein tayini diğer örneklerde olduğu gibi Lowry metoduna göre yapılmıştır ve protein

miktarı absorbanları ölçülmüştür. Bulunan absorbanlar, standart grafikte yerlerine koyularak Spesifik Enzim Aktivitesi ve Total Ünite hesaplanmıştır. (Şekil 4.16.)

4.13.2. Kolon Kromatografisi Sonrası Enzim Aktivitesi

Kolon kromatografisi sonrasında elde edilen saflaştırılmış enzim DNS indirgen şeker yöntemiyle spektrofotometrede 575 nm'de enzim aktivitesi ve enzim total ünitesi ölçülmüştür Protein tayini diğer örneklerde olduğu gibi Lowry metoduna göre yapılmıştır ve protein miktarı absorbanları ölçülmüştür. Bulunan absorbanlar, standart grafikte yerlerine koyularak Spesifik Enzim Aktivitesi ve Total Ünite hesaplanmıştır. (Şekil 4.16.)



Şekil 4.13. Kaba enzim, kısmi saflaştırma ve ileri saflaştırma işlemleri sonrası enzim aktivitesi

Safılaştırma işlemleri sonucunda enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir.

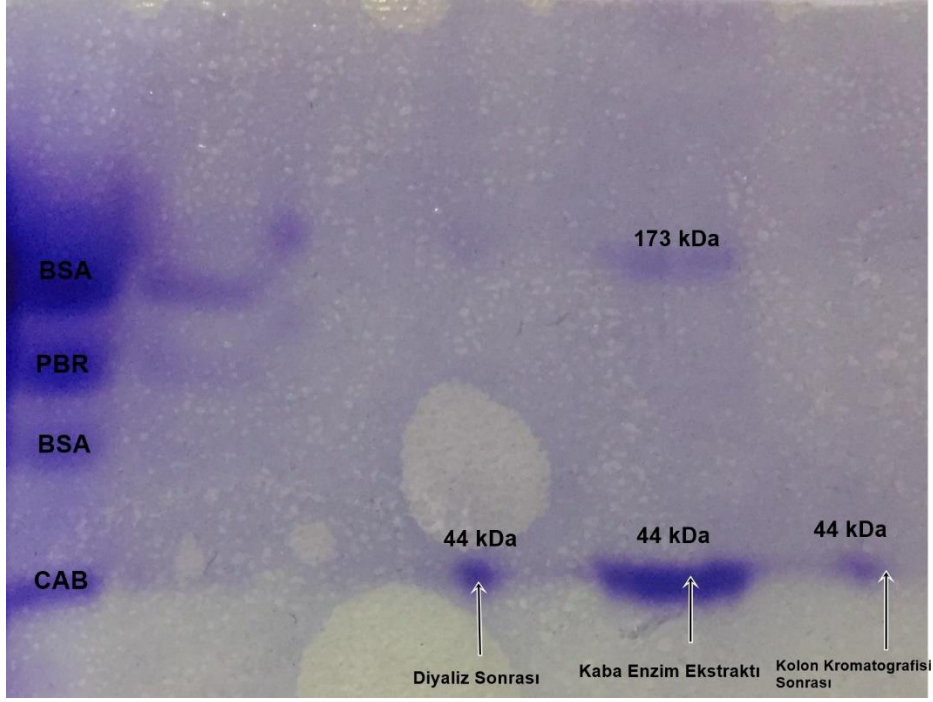
LSD testine göre kontrol grubu ile safılaştırma aşamaları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. ($p < 0,05$)

Çizelge 4.7. Kaba enzim ekstraktına göre kısmi ve ileri safılaştırma aşamalarının ortalama fark ve standart hataları

Kontrol	Safılaştırma Aşamaları	Ortalama Fark(U/mg)	Standart Hata
Kaba Enzim Ekstraktı	Diyaliz Sonrası	4,712	0,087
Kaba Enzim Ekstraktı	Kolon Kromatografisi Sonrası	7,278	0,087

4.14. SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlık Hesaplanması

Beauveria bassiana fungusundan elde edilen kaba enzim ekstraktı, kısmi safılaştırılmış ve kolon kromatografisitle safılaştırılmış enzim ekstraktlarının moleküler ağırlıkları SDS-PAGE yöntemiyle hesaplanmıştır. Rf değerleri ve moleküler ağırlıkları bilinen standart proteinler sayesinde çizilen grafik kullanılarak, moleküler ağırlıkları bilinmeyen enzim ekstraktlarının moleküler ağırlıkları belirlenmiştir.



Şekil 4.14. SDS-PAGE jel üzerinde kısmi saflaştırılmış ve ileri saflaştırılmış enzim ekstraktlarının moleküler ağırlıklarını belirleyen bant görüntüleri

Jel üzerindeki görüntüye bakılarak, kaba enzim 44 kDa ve 173 kDa, 2 bant şeklinde görülmüştür. Diyaliz sonrası ve kolon kromatografisi işlemleri sonundaki enzim yalnızca 44 kDa olarak görülmüştür. *Beauveria bassiana* Lül-1 suşundan elde edilmiş kitinaz enzimi moleküler ağırlığı 44 kDa olarak bulunmuştur.

4.15. Elde Edilen Enzim Ekstraktlarının Model Organizmalar Üzerindeki Sonuçları

4.15.1. Ekstraktların *Galleria mellonella* (Büyük Balmumu Güvesi) Larvaları Üzerindeki Sonuçları

Çalışmada *Galleria mellonella* larvaları üzerinde kaba enzim ekstraktı ve kolon kromatografisi sonrası ileri saflaştırılmış enzim ekstraktı kullanılarak daldırma ve püskürtme yöntemleri denenmiştir.

Her petriye 5'er larva eklenmiştir ve deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deney kontrol grubunun canlı kaldığı 28 gün boyunca sürmüş ve ölü sayısı 24 saatte bir kontrol edilmiştir.

Kullanılan enzim ekstraktları ile kontrol grubu arasında patojenite etkileri açısından, *Galleria mellonella* larvaları üzerine Kruskal-Wallis testine göre anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Püskürtme ve daldırma yöntemleri arasında Kruskal-Wallis testine göre anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Galleria mellonella larvaları üzerinde denen enzim ekstraktlarının LT_{50} değerleri SPSS programı Probit Analiz kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.15. *Galleria mellonella* ile kurulan deney düzeneği

Çizelge 4.8. *Galleria mellonella* kontrol grubu ve deney gruplarının ortalama ölüm değerleri ve ortalama ölüm zamanları

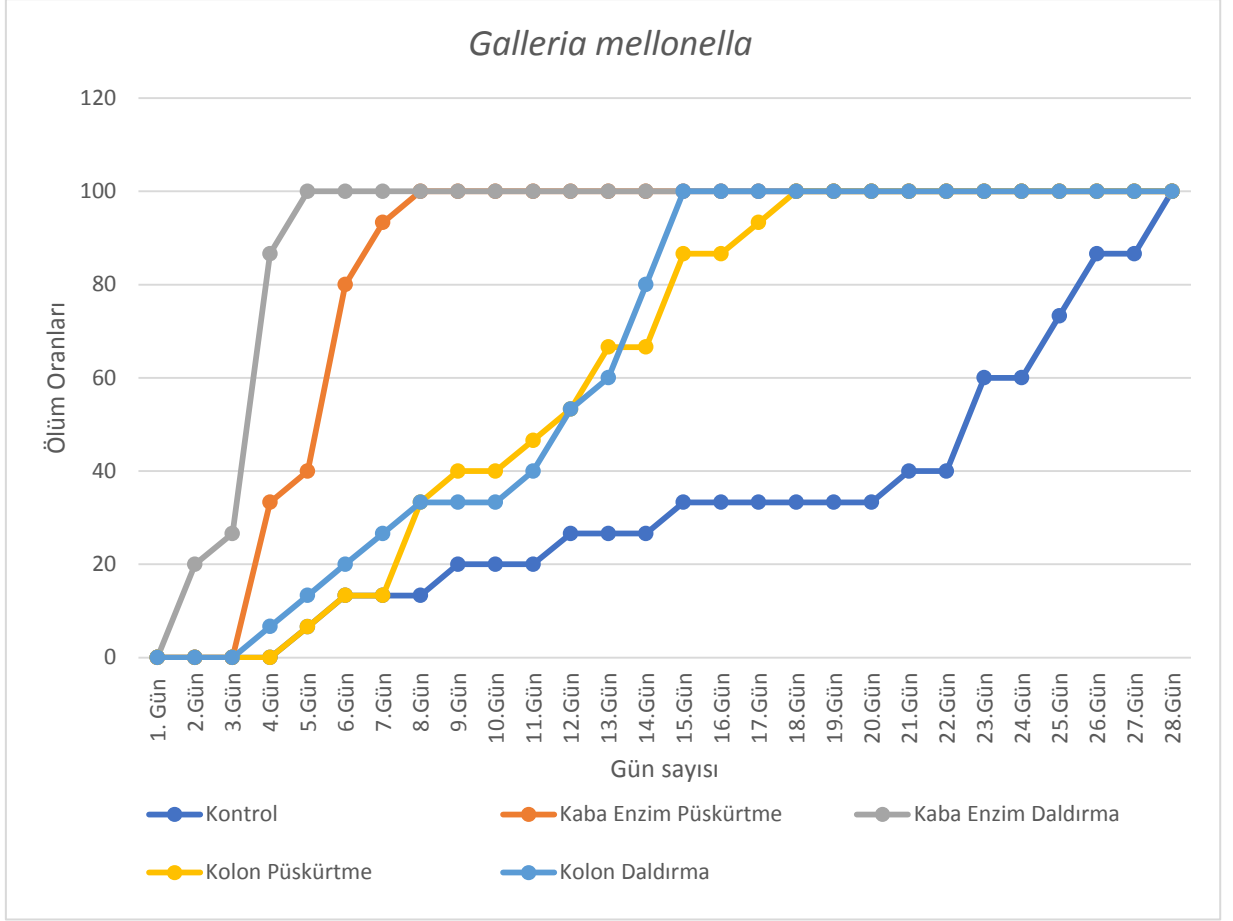
Galleria mellonella	Ortalama Ölüm Değerleri	Ortalama Ölüm Zamanı	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
Kontrol	5,000	25,6	4,110	3,084-6,916
Kaba Enzim Püskürtme	12,571	6	5,095	10,656-14,487
Kaba Enzim Daldırma	13,571	3,6	4,022	11,656-15,497
Kolon Püskürtme	9,357	15,6	6,014	7,441-11,253
Kolon Daldırma	9,643	13,6	6,014	7,727-11,559

Deney sonuçlarına bakıldığında hem kaba enzim hem de ileri saflaştırılmış enzimin daldırma yönteminde, püskürtme yöntemine göre daha etkili olduğu bulunmuştur.

Kaba enzim, ileri saflaştırılana göre daha çabuk öldürücü etkiye sebep olmuştur.

Çizelge 4.9. *Galleria mellonella* kontrol grubu ve deney grubunun LT50 değerleri

Galleria mellonella	LT50 değerleri	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
Kontrol	19,945	0,01	18,591-21,536
Kaba Enzim Püskürtme	5,084	0,13	4,657-5,511
Kaba Enzim Daldırma	3,143	0,21	2,769-3,553
Kolon Püskürtme	11,022	0,2	10,275-11,766
Kolon Daldırma	10,398	0,2	9,666-11,137



Şekil 4.16. *Galleria mellonella* kontrol grubu ve deney gruplarının günlere göre ölüm oranları

4.15.2. Ekstraktların *Tenebrio molitor* (Un Kurdu) Larvaları Üzerindeki Sonuçları

Çalışmada *Tenebrio molitor* larvaları üzerinde kaba enzim ekstraktı ve kolon kromatografisi sonrası ileri saflaştırılmış enzim ekstraktı kullanılarak daldırma ve püskürtme yöntemleri denenmiştir.

Her petriye 5'er larva eklenmiştir ve deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deney kontrol grubunun canlı kaldığı 35 gün boyunca sürmüş ve ölü sayısı 24 saatte bir kontrol edilmiştir.

Kullanılan enzim ekstraktları ile kontrol grubu arasında patojenite etkileri açısından, *Tenebrio molitor* larvaları üzerinde Kruskal-Wallis testine göre anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Püskürtme ve daldırma yöntemleri arasında Kruskal-Wallis testine göre anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tenebrio molitor larvaları üzerinde denenen enzim ekstraktlarının LT_{50} değerleri SPSS programı Probit Analiz kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.17. *Tenebrio molitor* ile kurulan deney düzeneği

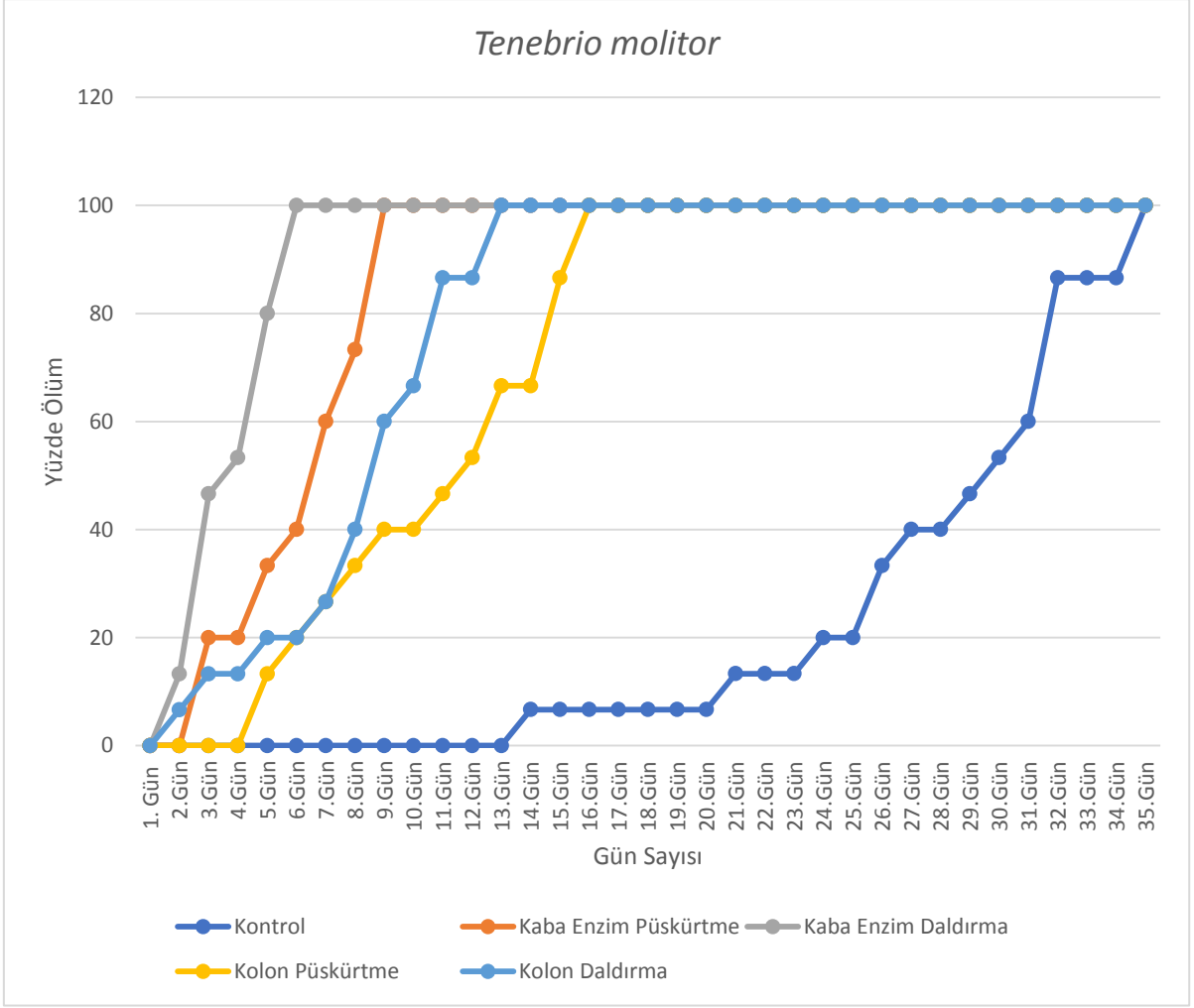
Çizelge 4.10. *Tenebrio molitor* kontrol grubu ve deney gruplarının ortalama ölüm değerleri ve ortalama ölüm zamanları

<i>Tenebrio molitor</i>	Ortalama Ölüm Değerleri	Ortalama Ölüm Zamanı	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
Kontrol	3,353	33,6	4,531	1,515-4,999
Kaba Enzim Püskürtme	13,000	8	4,299	10,887-14,370
Kaba Enzim Daldırma	14,088	4,6	2,822	11,944-15,278
Kolon Püskürtme	11,000	14,6	5,488	8,876-12,548
Kolon Daldırma	12,088	10	4,938	10,001-13,485

Deney sonuçlarına bakıldığında hem kaba enzim hem de ileri saflaştırılmış enzimin daldırma yönteminde, püskürtme yöntemine göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Kaba enzim, ileri saflaştırılana göre daha çabuk öldürücü etkiye sebep olmuştur.

Çizelge 4.11. *Tenebrio molitor* kontrol grubu ve deney grubunun LT50 değerleri

<i>Tenebrio molitor</i>	LT50 değerleri	Standart Hata	%95 Güven Aralığı
Kontrol	28,145	0,015	27,115-29,312
Kaba Enzim Püskürtme	5,978	0,06	5,416-6,543
Kaba Enzim Daldırma	3,562	0,124	3,097-4.014
Kolon Püskürtme	10,514	0,025	9,767-11,261
Kolon Daldırma	8,007	0,033	7,321-8,694



Şekil 4.18. *Tenebrio molitor* kontrol grubu ve deney gruplarının günlere göre ölüm oranları

5. TARTIŞMA

Kitinaz enzimi, doğada temelde 3 farklı amaç için organizmalarda bulunmaktadır. Bunlar; organizmaların büyümesi ve vücut büyüklüğünü arttırması için kabuğun kırılmasında, organizmaların kitin bulunduran diğer organizmalarla beslenebilmesi ve enerji eldesi için kitinin yıkılmasında ve organizmaların enfeksiyonu engellemek için kitin bulunduran mikroorganizmalara karşı bağışıklığını güçlü tutmak içindir [110].

Kitinazın farklı formları bakterilerde, funguslarda, böceklerde, bitkilerde ve omurgalılarda bulunmaktadır. Azot ve karbonu enerji kaynağı olarak kullanan bakteriler veya parazitik bakteriler kitinaz enzimi sentezleyebilmektedir [111]. Fungal kaynaklı kitinazlar ise, fungusun beslenmesinde, morfogenezde, gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Fungus kitinazları, GH18 (Glikozid Hidrolaz) ailesine aittir ve bitki kitinazlarına büyük ölçüde benzemektedir [112].

Tarımsal zararlılara karşı biyolojik kontrol, zararlının doğal düşmanı olan canlılar veya metabolitleri kullanılarak yapılan mücadeledir. Son yıllarda biyolojik kontrolün önem kazanmasıyla ve artan bilinçle birlikte kitinolitik enzimlerin tarım için kullanılması amaçlanarak enzim eldesi çalışmalarına ağırlık verilmiştir. Entomopatojen bir fungus olan *Beauveria bassiana*, topraktan ve çok çeşitli böceklerden izole edilmiş her yerde bulunabilen bir mikroorganizmadır. Bu entomopatojenin böcekler üzerindeki etkisi büyük oranda kitinaz enziminden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada Türkiye'den çeşitli lokalitelerden izole edilen *Beauveria bassiana* izolatları kullanılarak fungal kaynaklı kitinaz enzimi eldesi sağlanmış, kısmi ve ileri saflaştırılmış enzim ekstraktları, çeşitli depo zararlısı model organizmalar üzerine uygulanmıştır.

Bu çalışmada daha önceki çalışmalarda [87,88,89] Türkiye'den çeşitli lokalitelerden izole edilen 50 farklı *Beauveria bassiana* izolatıyla çalışmaya başlanmış, karides kabukları üzerinde üreme gösteren ve kolloidal kitinli katı besiyerinde en geniş açılma zonları oluşturan 10 suş belirlenmiş, çalışmaya onlarla devam edilmiştir. Bu suşlar; Lül-1, KVL 03129, BY8, BY9, L-1, Man2, Bb19, Rize, Ank-1, Ank-12 suşları olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.2., Şekil 4.3.)

Enzim üretimi için denenen sıvı besiyeri ortamları Basal Medium, Serratia Medium, Medium A besiyeri, Medium C besiyeridir.

Basal Medium besiyeri, Vyas ve arkadaşları (1989) tarafından *Myrothecium verrucaria* 'dan kitinaz enzimi eldesinde kullanılmıştır, ticari preparatlardan aktivite olarak 4 kat güçlü bir enzim eldesi sağlanmıştır [93]. Serratia Medium besiyeri, Monreal ve Reese tarafından (1969) *Serratia marcescens*'ten kitinaz enzimi üretiminde kullanılmıştır, bu çalışmada *Serratia marcescens*'in çok güçlü bir kitinaz üreticisi olduğu bulunmuştur [94]. Medium A ve Medium C besiyerleri, Deng ve arkadaşları tarafından (2007) *Trichoderma atroviride*'den endokitinaz aktivitesini arttırmak amacıyla hazırladığı farklı içerikli 5 besiyerinden ikisidir. Çalışmanın sonucunda bu besiyerlerinin ticari amaçlı enzim üretimi olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [95].

Çalışmamızda denenen bu besiyerlerine tarafımızdan seçilen 10 izolatın ekimi yapılarak, her gün spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır. Medium C besiyeri dışındaki besiyerlerinde enzim aktivitesi çok düşük miktarlarda bulunmuştur. Medium C besiyerinde de istenilen enzim aktivitesine ulaşamadığından, besiyeri tarafımızdan modifiye edilmiştir. Medium C besiyerinin modifiye edilmesiyle yeni bir besiyeri "Kobalt Medium Besiyeri" oluşturulmuş ve 10 günlük ölçümde aktivite değerleri istenilen düzeyde olduğundan çalışmaya Kobalt Medium Besiyeri ile devam edilmiştir. Diğer besiyeri ortamlarında fungusun istediği besin ortamının sağlanamadığı ve diğer sıvı besiyeri ortamlarında mikroorganizmanın proteaz enzimi salgılamasının kitinaz aktivitesini baskılamış olabileceği düşünülmektedir. Nitekim Leger ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada entomopatojen fungus *Beauveria bassiana*'dan kitinaz enziminin geç elde edilmesinin, kütikula proteinlerinin sindirilmesinden dolayı olduğunu, proteazın kitinaz enzimini baskılayabileceğini tespit etmişlerdir [113]. Kobalt Medium Besiyerinde yapılan ölçümler sonucunda izolatların içerisinde en yüksek aktiviteyi gösteren Lüleburgaz-1 (Lül-1) suşuyla çalışmalara devam edilmiştir.

Leger ve arkadaşları, 1996 yılında yaptıkları çalışmada entomopatojen fungus olan *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* ve *Beauveria bassiana*'dan elde edilen kitinazın karakterizasyonu ve yapısal lokasyonunu *Manduca sexta* üzerinde tutunmasını incelemişlerdir. *Beauveria bassiana*'dan elde edilen kitinaz

enziminin SDS-PAGE uygulayarak moleküler ağırlığını 43-45 kDa arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Kim ve arkadaşları (2010), *Beauveria bassiana* SFB 205 izolatının üretim ortamı süpernatantından elde ettikleri kitinaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile ölçüp yaklaşık 50 kDa olarak bulmuşlardır [118].

Bu çalışmada, *Beauveria bassiana* fungusundan kaba enzim olarak elde edilmiş, amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmış ve kolon kromatografisiyle saflaştırılmış enzim ekstraktlarının moleküler ağırlıkları SDS-PAGE yöntemiyle hesaplanmıştır. (Şekil 4.21.) Kaba enzim ekstraktı 44 kDa ve 173 kDa ağırlıkta iki bant vermiştir. Kaba enzim kompleksinin, SDS-PAGE'de iki bant olarak görülmesinin sebebi tam olarak saflaştırma sağlanmadığı için içeriğinde proteaz, lipaz gibi diğer litik enzimlerin de bulunması olabilir. Çöktürme ve kolon kromatografisi sonrası enzim ekstraktlarının 44 kDa büyüklüğünde olduğu Rf değerleri bilinen standart proteinler sayesinde belirlenmiştir. Bu büyüklük *Beauveria bassiana* fungusundan elde edilen kitinaz enzimiyle yapılan Leger ve ark (1996), Suresh (1996), Kim ve ark (2010) çalışmaları ile benzerlik göstermektedir [113,114,118]. Enzimin moleküler ağırlığının elde edildiği organizmaya, hatta aynı organizmanın farklı yerlerden elde edilen izolatları arasında bile değişkenlik gösterdiği çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir [2,116,117].

Leger ve arkadaşları (1996), böcek kütikulasına tutunurken, proteaz ve kitinazların birlikte sinerjik etkiyle etki ettiklerini göstermişlerdir. Kitinaz enziminin geç elde edilmesinin, fungus böcek kütikulasına tutunurken öncelikle kütikula proteinlerinin sindirilmesinden dolayı olduğunu, proteazın kitinaz enzimini baskılayabileceğini tespit etmişlerdir. *B. bassiana* için, en iyi enzim aktivitesini 27°C'de pH 3-5 arasında, 4 gün inkübasyonla elde etmişlerdir [113].

Bu çalışmada *B. bassiana* Lüleburgaz-1 izolatından elde edilen enzimin kaba enzim olarak elde edilmesi süzme ve santrifüj işlemleriyle yapılmıştır. En yüksek enzim aktivitesi kaba enzimde 2,363 U mg⁻¹ bulunmuştur. (Şekil 4.9.) Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık *B. bassiana*'nın da optimum üreme sıcaklığı olan 28°C bulunmuştur. (Şekil 4.11.) Enzim geniş bir pH aralığında aktivite göstermiş olup (pH 2-pH 10), optimum pH'ı 3,50 olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.15)

Suresh ve Chandraseran, 1999 yılında yaptıkları çalışmada deniz sedimentinden elde ettikleri *B. bassiana* izolatlarından SSF (katı faz fermentasyon) tekniğiyle kitinaz enzimi üretmişlerdir. Enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu optimum sıcaklığı 28°C bulmuşlardır. Enzim için en uygun inkübasyon süresi 72 saat olarak belirlenmiştir. [114].

Bu çalışmada da enzim geniş bir inkübasyon süresi aralığında aktivite göstermiş olup, ideal inkübasyon süresi 72 saat olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.7.) Enzim aktivitesine inokülüm miktarının etkisi incelenmiş ve ideal inokülüm miktarı 1000 µl olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.13) Enzim aktivitesine bekletme sıcaklığının etkisini ölçmek amacıyla, enzim ve substrat çeşitli sıcaklıklarda bir araya getirilmiş, en yüksek aktiviteye 1 saat 50°C inkübasyon ile ulaşılmıştır. (Şekil 4.17) Elde edilen sonuçlar, Leger ve ark. (1996), Suresh ve Chandrasen (1999), Kim ve ark (2010) çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir [113,114,118].

Yuli ve arkadaşları, 2004 yılında Endonezya'daki kaplıcalardan izole ettikleri termofilik *Bacillus spp.*'yi laboratuvar ortamında %0,5'lik kitin içeren ortamda 55°C'de inkübe etmişlerdir. Ölçümlerle ekzokitinaz sentezlediğini doğrulamışlardır. 72 saatlik inkübasyondan sonra, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerini uygulamış ardından DEAE Sephacel kolon kromatografisinden geçirip saflaştırmışlardır. Saflaştırma sonrasında enzim aktivitesinde düşüş gözlemlenmişlerdir [115]. Çağlar, 2005 yılında yaptığı çalışmada, *Trichoderma atroviride*'nin ürettiği kitinaz enzimini incelemiştir. *T. atroviride*' den yer değiştirme yöntemi kullanılarak, %0,1 kitin içeren besiyeri ortamında 30°C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılarak maksimum enzim aktivitesi elde edilmiştir. Çağlar, aynı çalışmada, amonyum sülfat, etanol, aseton ve trikloroasetik asit çöktürmelerinin kitinaz enzim aktivitesine etkisini incelemiş, spesifik kitinaz aktivitesini 2.339 U/mg olarak bulmuştur. Çöktürme yöntemleri arasından, en yüksek kitinaz aktivitesinin görüldüğü %70 oranda amonyum sülfat çöktürmesi olarak belirlenmiş, çöktürme sonrası aktivitede düşüş olmuş ve 0.254 U/mg olarak bulunmuştur [48].

Bu çalışmada, enzimin ileri saflaştırılması için Yuli (2004), Çağlar (2005) ve Kuzu (2008) 'nun çalışmalarında kitinaz enziminde en iyi aktiviteyi gözlemlediği amonyum sülfat çöktürmesi ve enzim tamponu ile diyaliz işlemleri uygulanmıştır

[2,48]. Bu çalışmada amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonrasında enzim aktivitesi $0,641 \text{ U mg}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Kolon kromatografisi sonrası $0,417 \text{ U mg}^{-1}$ olarak bulunmuştur. (Şekil 4.19.) Bu çalışmada da saflaştırma aşamalarından sonra enzim aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir. Bu düşüşün enzimin saflaştırılması ve miktarının azalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bulgular, Yuli ve ark (2004), Kim ve ark (2010), Çağlar (2005), Kuzu (2008) çalışmalarındaki saflaştırma bulgularıyla paralellik göstermektedir [2,48,115,118].

Kim ve arkadaşları (2010), *Beauveria bassiana* SFB 205 izolatının üretim ortamı süpernatantından elde ettikleri kitinaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi yöntemiyle kısmi saflaştırmış, izotridesil eter ile karıştırıp, pamuk yaprak bitlerine karşı etkinliğini ölçmüştür. Çalışmanın sonucunda kısmi saflaştırılmış enzimin, Tween 80 uygulanan kontrol grubuna karşı, yaprak bitlerinde ciddi derecede ölüme sebep olduğunu göstermişlerdir [118]. Binod ve arkadaşları (2007), Patil ve arkadaşları (2015), *Penicillium ochrochloron*'dan elde ettikleri kitinaz enzimini, kolon kromatografisi kullanarak saflaştırmış ve *Helicoverpa armigera* üzerinde etkinliğini çeşitli konsantrasyonlarda püskürtme ve daldırma yöntemleriyle denemişlerdir. En yüksek ölüm oranı, 2000 U mL^{-1} kitinaz aktivitesinde görülmüştür. Enzimin larvaların büyümesini ve metamorfozunu olumsuz etkilediğini göstermişlerdir [119,120].

Bu çalışmada elde edilen enzim ekstraktları kaba enzim ve kolon sonrası ileri saflaştırılmış iki ekstrakt olarak, depo zararlısı olan *Galleria mellonella* (Büyük Balmumu Güvesi) ve *Tenebrio molitor* (Un Kurdu) model organizmaları üzerinde püskürtme ve daldırma yöntemleri kullanılarak denenmiştir. (Şekil 4.22., Şekil 4.24.) Kaba enzim ekstraktının, ileri saflaştırılmış enzim ekstraktına göre etkinliğinin daha fazla olmasını enzim aktivitesinin saflaştırmayla ters orantılı olmasına ve kaba enzim ekstraktında kitinaz dışında proteaz, lipaz gibi diğer litik enzimlerin de bulunması olabileceği düşünülmektedir.

Brodway ve arkadaşları (1998), Gongora ve arkadaşları (2001) yaptıkları çalışmalarda *Streptomyces albidoflavus*'tan elde ettikleri kitinaz enzim kompleksini (endokitinaz, ekzokitinaz ve glukozaminidazdan oluşan) tütün zararlısı *Heliothis virescens*, lahana zararlısı *Trichoplusia ni*, limon zararlısı *Bemisia argentifolii*, patates zararlısı *Myzus persicae* ve kahve zararlısı *Hypothenemus hampei*

üzerinde denemişlerdir. Enzim kompleksinin tarım zararlısı canlıların büyümesini ve gelişmesini durdurduğunu ve ölümlerine sebep olduğunu göstermişlerdir [121,122]

Bu çalışmada, *Galleria mellonella* ile kurulan deneyde her petriye 5'er larva koyulmuş, kontrol grubu 28 gün yaşamıştır. Kaba enzim daldırma yöntemi 5 günde, püskürtme yöntemi 8 günde tüm böceklerin ölümüne sebep olmuştur. Kolondan saflaştırılan enzim ise, daldırma yönteminde 15 günde, püskürtme yönteminde 18 günde tüm böceklerin ölümüne sebep olmuştur. (Çizelge 4.8.) Deney sonuçları IBM SPSS Statistic 23 programında analiz edilmiş, Kruskal-Wallis istatistik yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlarda kontrol grubu ve deney grupları arasında anlamlı bir fark görülmüştür. ($p < 0,05$) Daldırma yöntemi ve püskürtme yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p > 0,05$)

Galleria mellonella ile kurulan deneyde LT50 değerleri SPSS Probit Analiz ile hesaplanmıştır. (Çizelge 4.9.) Kontrol grubu LT50 değeri 19,94 iken, LT50 değerlerine bakılarak en etkili ekstraktın kaba enzimin daldırma yöntemi (3,14) olduğu, etkisi en az görülen kolondan saflaştırılan enzimin püskürtme yöntemi için (11,02) olmuştur.

Tenebrio molitor ile kurulan deneyde her petriye 5'er larva koyulmuş, kontrol grubu 35 gün yaşamıştır. Kaba enzim daldırma yöntemi 6 günde, püskürtme yöntemi ile 9 günde tüm böceklerin ölmesine sebep olmuştur. Kolondan saflaştırılan enzim ise, daldırma yönteminde 16 günde, püskürtme yönteminde 13 günde tüm böceklerin ölmesine sebep olmuştur. (Çizelge 4.10.) Deney sonuçları IBM SPSS Statistic 23 programında analiz edilmiş, Kruskal-Wallis istatistik yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlarda kontrol grubu ve deney grupları arasında anlamlı bir fark görülmüştür. ($p < 0,05$) Daldırma yöntemi ve püskürtme yöntemi arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p > 0,05$)

Tenebrio molitor ile kurulan deneyde LT50 değerleri SPSS Probit Analiz ile hesaplanmıştır. (Çizelge 4.11.) Kontrol grubu LT50 değeri 28,14 iken, LT50 değerlerine bakılarak en etkili ekstraktın kaba enzimin daldırma yöntemi (3,56) olduğu, etkisi en az görülen kolondan saflaştırılan enzimin püskürtme yöntemi (10,51) olmuştur.

Bu çalışmadaki, her iki model organizma deneyinde de daldırma yöntemi, püskürtme yöntemine göre daha başarılı olmuştur. Bunun sebebi, enzim ekstraktlarının larvanın vücudunun daha büyük bir yüzeyiyle temas etmesi olabilir. *Galleria mellonella* ve *Tenebrio molitor* zerinde denenmiş olan kitinaz enzim ekstraktları Kim ve arkadaşları (2010), Binod ve arkadaşları (2007), Patil ve arkadaşları (2015), Broadway ve arkadaşları (1998), Gongora ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmalarla benzer nitelikler göstermiştir. Diğer çalışmalarda olduğu gibi larvaların büyümesini olumsuz etkilemiş, ölümlerine sebep olmuştur [118,119,120,121,122].

Yapılan alışmada *Beauveria bassiana* fungus izolatlarının kitinaz enzimi eldesinde başarısı yüksek bir organizma olduğu, geniş sıcaklık ve pH aralığında aktif olduğu ve ileri çalışmalarda kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. *Beauveria bassiana* izolatlarından elde edilen kitinaz enzimi, zararlılarla biyolojik kontrolde ve biyoremediasyonda kitin içeren atıkların temizlenmesi için kullanılabilir. Bu alışmanın *Beauveria bassiana* fungusundan daha ileri saflaştırma aşamalarına nc olmasını ve kitinolitik enzimlerin kullanımının biyolojik mücadeleye kazandırılmasında yeni çalışmaları teşvik edeceği düşünülmektedir. Bu alışma, önümüzdeki yıllarda biyolojik bir kontrol ajanı olarak fungus kaynaklı kitinazın, tarım zararlıları üzerinde kullanılabilecek etkili bir mücadele yöntemi olduğunu doğrulamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Hansoylu, R.B., Türkiye topraklarından izole edilen entomopatojen fungus *Beauveria bassiana* suşlarının biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılması, Hacettepe Üniversitesi Bilim Uzmanlığı Tezi, 47-67, Ankara, **2003**.
- [2] Kuzu, S.B., Kitinaz üreten *Bacillus* izolasyonu, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu, Çukurova Üniversitesi Yüksek lisans tezi, 66-81, **2008**.
- [3] Zeman, N.W. and McCREA, J. M., α -Amylase Production Using a Recombinant DNA Organism, *Cereal Foods World*, 777-780, **1985**.
- [4] Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sorlie M, Varum KM, Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine., 517, **2010**.
- [5] Gooday, W., Aggressive and defensive roles for chitinases, 158-170, **1999**.
- [6] Aerts, J.M.F.G., Boot, R.G., Renkema, G.H., et al., "Chitotriosidase: a human macrophage chitinase that is a marker for Gaucher disease manifestation, *Chitin Enzymology*, 3-10, **1996**.
- [7] Escott, G.M., Walters, C.E., Ingham, E., Adams, D.J., "Expression of chitinase activity during monocyte differentiation, *Chitin Enzymology*", Vol.2. Grottammare: Eur. Chitin Soc., p. 11-20, **1996**.
- [8] Roberts, K.W., and Selitrennikoff, C.P., Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity, 169-176, **1988**.
- [9] Martinez CP, Echeverri C, Florez JC, Gaitan AL, Gongora CE, In vitro production of two chitinolytic proteins with an inhibiting effect on the insect coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae) and the fungus *Hemileia vastatrix* the most limiting pests of coffee crops, **2012**.
- [10] Kim, H-S., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N., Characterization of achitinolytic enzyme from *Serratia* sp. KCK isolated from kimchi juice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75: 1274-1281, **2007**.
- [11] Rehner SA, Minnis AM, Sung GH, Luangsa-ard JJ, Devotto L, Humber RA. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*.;103:1055–73, **2011**.
- [12] Bidochka, M.J., Menzies, F.V., Kamp, A.M., Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences, 531-538, **2002**.

- [13] Smith, Rebecca J., and E. A. Grula, Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*, 319-326, **1983**.
- [14] Parui, R. , Gambhir, K.K. , Cruz, I. , Hosten, A.O., Erythrocyte carbonic anhydrase: a major intracellular enzyme to regulate cellular sodium metabolism in chronic renal failure patients with diabetes and hypertension, **1992**.
- [15] Kabir KE, Sugimoto H, Tado H et al., Effect of *Bombyx mori* chitinase against Japanese pine sawyer (*Monochamus alternatus*) adults as a biopesticide. Biosci Biotechnol Biochem 70: 219–229, **2006**.
- [16] Ulusoy, M., Entomopatogen fungus *Beauveria Bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill Sporlarının Bazı Zararlı Böcekler Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 6-87, **2016**.
- [17] Kaaya GP, Mwangi EN, Ouna EA, Prospects for biological control of live-stock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma varigatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. J Invertebrate Pathol. 67: 15–20, **1996**.
- [18] Glare TR, Goettel MS, Eilenberg J, (2010), Addendum: Entomopathogenic Fungi and Their Role in Regulation of Insect Populations, **2004**.
- [19] Samson RA, Evans HC, Latg JP, Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Berlin Heidelberg, New York, **1988**.
- [20] Shaw KE, Davidson G, Clark SJ, Ball BV, Pell JK, Chandler D, Sunderland KD, Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera* Biol Control 24:266–276, **2002**.
- [21] Rath, A.C., The Use of Entomopathogenic Fungi for Control of Termites. Biocontrol Science and Technology, 10:5, 563-581, **2000**.
- [22] Steinhaus, E, Concerning the harmlessness of insect pathogens and the standardization of microbial control products. *Journal of Economic Entomology*, 50: 714–720, **1957**.
- [23] Shimazu, M, Mitsuhashi, W and Hashimoto, H., *Cordyceps rongniartii* sp. nov., the teleomorph of *Beauveria brongniartii*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 29: 323–330, **1988**.
- [24] Rehner, SA., “Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*”. In *Insect-fungal associations. Ecology and evolution*, Edited by: Vega, FE and Blackwell, M. 3–27. Oxford: University Press, **2005**.

- [25] Audoin, Nouvelles expériences sur la nature de la maladie contagieuse qui attaque les Vers à soie, et qu'on désigne sous le nom de Muscardine, Annales des Sciences Naturelles, 8, pp. 257-270, **1837**.
- [26] Ferron, P., Biological control of insects by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology, 23, 409-42, **1978**.
- [27] Castrillo, L.A., Roberts, D.W., Vandenberg, J.D., The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. Journal of Invertebrate Pathology, 89, 46-56, **2005**.
- [28] Hajek, A.E., Leger, R.J. St., Interactions between fungal pathogens and insects hosts. Annual Review of Entomology, 39, 293-322, **1994**.
- [29] Erkiliç, L., Uygun, N., Entomopatojen Fungusların Biyolojik Mücadelede Kullanılma Olanakları, Türkiye Entomoloji Dergisi, 110-6960, 117-128, **1993**.
- [30] Zimmermann, G., Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology, 17, 550-590, **2007**.
- [31] Zimmermann, G., Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology, 17, 869-910, **2007**.
- [32] Goettel, M.S., Eilenberg, J., Glare, T., Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In "Comprehensive Molecular Insect Science.", 360- 400, **2005**.
- [33] Müller-Kögler, E., Pilzkrankheiten bei Insekten, Anwendung zur biologischen Schädlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie, Berlin: P. Parey Verlag, **1965**.
- [34] Krieg, A, Gröner, A, Huber, J and Zimmermann, G., Inaktivierung von verschiedenen Insektenpathogenen durch ultraviolette Strahlen, *Journal of Plant Diseases and Protection*, 88: 38–48, **1981**.
- [35] T.M. Butt, C. Jackson, N. Magan Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems, and Potential CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, **2001**.
- [36] L. Alberghina, R.D. Schmid, R. Verger Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering, Weinheim Federal Republic of Germany, New York, **1991**.
- [37] C.C. Akoh, S.W. Chang, G.C. Lee, J.F. Shaw Enzymatic approach to biodiesel production J. Agric. Food Chem., 8995-9005, **2007**.

- [38] Pandey, S., Benjamin, C.R., Soccol, P., Nigam, N., Krieger, V.T., Soccol, The realm of microbial lipases in biotechnology *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 119-131, **1999**.
- [39] S. Ali, Z. Huang, S.X. Ren Production and extraction of extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroseus* (Cordycipitaceae:Hypocreales) *Biocontrol. Sci. Technol.*, 19 , pp. 81-89, **2009**.
- [40] W.O.B. Silva, L. Santi, A. Scharank, M.H. Vainstein, *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection *Fungal Biol.*, 144 , pp. 10-15, **2010**.
- [41] J. Sharma, A. Singh, R. Kumar, A. Mittal Partial purification of an alkaline protease from a new strain of *Aspergillus oryzae* AWT 20 and its enhanced stabilization in entrapped Ca-alginate beads *Internet J. Microbiol.*, 2, pp. 1-14, **2006**.
- [42] Mustafa, U., Kaur, G., Extracellular enzyme production in *Metarhizium anisopliae* isolates *Folia Microbiol.*, 54, pp. 499-505, **2009**.
- [43] C. Wang, M.A. Typas, T.M. Butt, Detection and characterization of *Pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* *FEMS Microbiol. Lett.*, 213 , pp. 251-255, **2002**.
- [44] S.Q. Liu, Z.H. Meng, J.K. Yang, Y.K. Fu, K.Q. Zhang Characterizing structural features of cuticle-degrading proteases from fungi by molecular modeling *BMC Struct. Biol.*, 7, p. 33, **2007**.
- [45] W. Fang, J. Feng, Y. Fan, Y. Zhang, M.J. Bidochka, R.J. St. Leger, Y. Pei Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana* *J. Invertebr. Pathol.*, 102, pp. 156-160, **2009**.
- [46] J. Castellanos Moguel, M. González, Barajas, T. Mier, M.R. Reyes, Montes, E. Aranda, C. Toriello, Virulence testing and extracellular subtilisin-like (*Pr1*) and trypsina-like (*Pr2*) activity during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aeyrodidae), **2007**.
- [47] R.N. Tharanathan, F.S. Kittur- Chitin—the undisputed Biomolecule of great potential *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43, 63-86, **2003**.
- [48] Caglar, Z., *Trichoderma atroviride*'den Elde Edilen Kitinazın Kısmi Saflaştırılması, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2005**.

- [49] Z.X. Lu, A. Laroche, H.C. Huang Isolation and characterization of chitinases from *Verticillium lecanii* Can. J. Microbiol., 51, 1045-1055, **2005**.
- [50] D.J. Adams, Fungal cell wall chitinases and glucanases Microbiology, 150, pp. 2030-2034, **2004**.
- [51] Hiloğlu, M., Bitki Kitinazları Moleküler Yapıları, Önemleri ve Kullanımları, Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Dergisi, 7(3): 65-71, **2017**.
- [52] Adrangi, S., & Faramarzi, M. A. , From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. *Biotechnology advances*, 31(8), 1786-1795, **2013**.
- [53] Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1573), **1987**.
- [54] Brzezinska, M. S., Jankiewicz, U., & Lisiecki, K., Optimization of cultural conditions for the production of antifungal chitinase by *Streptomyces sporovirgulis*. *Applied biochemistry and microbiology*, 49(2), 154-159, **2013**.
- [55] Aggarwal, C., Paul, S., Tripathi, V., Paul, B., & Khan, M. A., Chitinase producing *Serratia marcescens* for biocontrol of *Spodoptera litura* (Fab) and studies on its chitinolytic activities. *Ann. Agric. Res*, 36(36), 132-137, **2015**.
- [56] Danişmazoğlu, M., Demir, I., Sezen, K., Muratoğlu, H., & Nalçacıoğlu, R., Cloning and expression of chitinase A, B, and C (chiA, chiB, chiC) genes from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 78-87, **2015**.
- [57] Prasanna, L., Eijsink, V. G., Meadow, R., & Gåseidnes, S., A novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(4), 1601-1611, **2013**.
- [58] Suganthi, M., Senthilkumar, P., Arvinth, S., & KN, C., Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *Helopeltis theivora*. *The Journal of general and applied microbiology*, 63(4), 222-227, **2017**.
- [59] Chan, Y. L., Cai, D., Taylor, P. W. J., Chan, M. T., & Yeh, K. W., Adverse effect of the chitinolytic enzyme PjCHI-1 in transgenic tomato on egg mass production and embryonic development of *Meloidogyne incognita*. *Plant pathology*, 59(5), 922-930, **2010**.

- [60] Soares, A. M. D. S., Araújo, S. A. D., Lopes, S. G., Junior, C., & Martins, L., Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* protein extracts on *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(4), 396-401, **2015**.
- [61] Braga, F. R., Soares, F. E. F., Giuberti, T. Z., Lopes, A. D. C. G., Lacerda, T., de Hollanda Ayupe, T., Queiroz, J. H., Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. *Veterinary parasitology*, 212(3-4), 214-218, **2015**.
- [62] Inbar, J., & Chet, I., The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 141(11), 2823-2829, **1995**.
- [63] Berini, F., Katz, C., Gruzdev, N., Casartelli, M., Tettamanti, G., & Marinelli, F., Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnology advances*, **2018**.
- [64] Daniel, AE, Hamblin, MR, Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials, 4(3): 411–427, **2016**.
- [65] Rinaudo, M, Chitin and chitosan: Properties and applications, Progress in Polymer Science, Pages 603-632, **2006**.
- [66] Koçer, İ., Farklı Yöntemlerle Kitosan Eldesi ve Karakterizasyonu, Hacettepe Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 18-64, **2015**.
- [67] Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S.V., Tamura, H., Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications, *Biotechnology Advances*, 28, 142-150, **2010**.
- [68] Damour, O., Gueugniaud, P.Y., Berthin-Maghit, M., Rousselle, P., Berthod, F., Sahuc, F., Collombel, C., A dermal substrate made of collagen-GA-chitosan for deep burn coverage: First clinical uses, Volume 15, Issue 4, 273-276, **1994**.
- [69] El Hadrami, A.; Adam, L.R.; El Hadrami, I.; Daayf, F., Chitosan in Plant Protection, *Mar. Drugs* 8, 968-987, **2010**.
- [70] Kumar, M.N.V.R., "A review of chitin and chitosan applications", *React. Funct. Polym.*, 46: 1-27, **2000**.
- [71] Agullo, E, Rodríguez, M.S., Ramos, V., Albertengo, L., Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food, *Macromol. Biosci.* 3, 521–530, **2003**.
- [72] Hirano, S., Chitin Biotechnology Applications, *Biotechnology Annual Review*, (eds: El-Gewely, M.R.), Elsevier, 237-258, **1996**.

- [73] Alonso et al., Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles, *Carbohydrate Polymers* 77 (3), pp. 536-543, **2009**.
- [74] Abdel-Halim, E.S., Abdel-Mohdy, F.A, Al-Deyab, S.S., El-Newehy, M.H., Chitosan and monochlorotriazinyl- β -cyclodextrin finishes improve antistatic properties of cotton/polyester blend and polyester fabrics, *Carbohydrate Polymers*, Volume 82, Issue 1, 202-208, **2010**.
- [75] Mao, J.S., Liu, H.F., Yin, Y.J., Yao, K.D., The properties of chitosan gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods, *Biomaterials*, 24, 1621-1629, **2003**.
- [76] Belli, A., Biyopolimerik kitosan ve kullanım alanları, *Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Bitirme Ödevi*, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, **2012**.
- [77] Spagna, G., Barbagallo, R.N., Casarini, D., Pifferi, P.G., A novel chitosan derivative to immobilize α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies, *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 427-438, **2001**.
- [78] Duman, Y. , Üçlü Faz Ayrımı (ÜFA) ile Geleneksel Enzim Saflaştırma Tekniğinin Karşılaştırılması; ÜFA ile Saflaştırılan β -Galaktosidazın Termodinamik Özellikleri, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 6.3: 107-117, **2003**.
- [79] Dennison, Clive. *A guide to protein isolation*. Vol. 3. Springer Science & Business Media, **2013**.
- [80] Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ, *Protein Methods*, Second Edition, Wiley-Liss, New York, 415p, **1994**.
- [81] Çelebier, İ, Nişasta İçeren Atıklardan Mikrobiyal Amilazın Elde Edilmesi, Hacettepe Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, 33-100, **2016**.
- [82] Aktümsek, A., Nurulloğlu, Z. Ü., & Kalyoncu, L., *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) larva ve pupunun yağ asidi bileşimi. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 1(17), 29-32, **2000**.
- [83] Kwadha, C. A., Ong'amo, G. O., Ndegwa, P. N., Raina, S. K., & Fombong, A. T., The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8(2), 61, **2017**.
- [84] Smith T. External morphology of the larva, pupa, and adult of the wax moth, *Galleria mellonella* L. *J. Kans. Entomol. Soc.*, 287–310, **1965**.

- [85] Ghaly, AE., and Alkoaik, FN., The yellow mealworm as a novel source of protein. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 4:4: 319-331, **2009**.
- [86] Siemianowska, E., Kosewska, A., Aljewicz, M., Skibniewska, K.A., Polak-Juszczak, L., A. Jarocki, Jędras, M., Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. *Agricultural Sciences* 4:6, 287-291, **2013**.
- [87] Uztan, A. H., Gunyar, O.A., Yoltas, A., Keskin, N., Isolation And Identification Of Entomopathogenic Fungi *Beauveria Bassiana* From Turkey, *Fresenius Environmental Bulletin* Volume: 25 Issue: 12 Pages: 5180-5185, **2016**.
- [88] Doğan, Y., Türkiye Topraklarından Elde Edilen Entomopatojen Fungusların Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak Kullanılması, Hacettepe Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 7-50, **2009**.
- [89] Yıldız, S.S, Entomopatojen Fungus *Beauveria Bassiana* Ve *Paecilomyces Fumosozeus* Sporlarının Bazı Vektör Sinekler Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 5-60, **2015**.
- [90] Meyling, N., V. ve Eilenberg, J., Ecology of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in Temperate Agroecosystems: Potential for Conservation Biological Control, *Biol. Cont.*, 43, 145-155, **2007**.
- [91] Rodríguez-Gómez, D., et al., Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25.3: 513-518, **2009**.
- [92] Ortiz-Urquiza, A., Riveiro-Miranda, L., Santiago-Alvarez, C., Quesada-Moraga, E., Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(3), 270-278, **2010**.
- [93] Vyas, P., & Deshpande, M. V., Chitinase production by *Myrothecium verrucaria* and its significance for fungal mycelia degradation, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 35(5), 343-350, **1989**.
- [94] Monreal, J., & Reese, E. T., The chitinase of *Serratia marcescens*, *Canadian Journal of Microbiology*, 15(7), 689-696, **1969**.
- [95] Deng, S., Lorito, M., Penttilä, M., & Harman, G. E., Overexpression of an endochitinase gene (ThEn-42) in *Trichoderma atroviride* for increased production of antifungal enzymes and enhanced antagonist action against pathogenic fungi, *Applied biochemistry and biotechnology*, 142(1), 81, **2007**.

- [96] Homthong, M., Kubera, A., Srihuttagam, M., Hongtrakul, V., Isolation and characterization of chitinase from soil fungi, *Paecilomyces sp.*, *Agriculture and Natural Resources* 50, 232-242, **2016**.
- [97] Mishra, P., Singh, S.K., Nilegaonkar, S.S, Extracellular chitinase production by some members of the saprophytic Entomophthorales group, *Mycoscience* (52 :271–277), **2010**.
- [98] Rojas-Avelizapa, L. I., Cruz-Camarillo, R., Guerrero, M. I., Rodríguez-Vázquez, R., & Ibarra, J. E., Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(2), 299-308, **1999**.
- [99] Miller, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428, **1959**.
- [100] Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275, **1951**.
- [101] Oreste, M., Bubici, G., Poliseno, M., Triggiani, O., Tarasco, E., Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. And *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin Against *Galleria mellonella* L. And *Tenebrio molitor* L. In *Laboratory Assays*, REDIA, XCV, 43-48, **2012**.
- [102] Abebe, H., Potential of entomopathogenic fungi for the control of *Macrotermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae), Ph.D. thesis, Addis Ababa University, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ethiopia, 161p, **2001**.
- [103] Özgör, E., Isparta ve Burdur İlleri Bal Arılarında (*Apis Mellifera* L.) Kış Sonu Kayıplarının Mikrobiyal ve Paraziter Hastalıklar Yönünden İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2012**.
- [104] Baltacı, O., Niemann-Pick C2 Proteininin (Bnpc2) Sığır Sütünden Saflaştırılması ve Kolesterolün Taşınmasındaki Rolünün Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, **2009**.
- [105] Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N., & Kotan, R., Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*, *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 13(1), 35, **2014**.

- [106] Temizkan, G., Arda N., *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Nobel Matbaacılık, 193-226, İstanbul, **2008**.
- [107] Vänninen, I., Husberg, G.-B., Hokkanen, H.M.T., Occurrence of entomopathogenic fungi and entomoparasitic nematodes in cultivated soils in Finland, *Entomologica Fennica*, 53, 65-71, **1989**.
- [108] Güven, Ö., Çayır, D., Baydar, R., & Karaca, İ., Entomopatojen fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vull. İzolatlarının patates böceği *Leptinotarsa decemlineata* Say. (Coleoptera: Chrysomelidae) üzerindeki etkisi. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 6(2), 105-114, **2015**.
- [109] Mondal, S., Bakshi, S., Koris, A., Vatai, G., Journey of enzymes in entomopathogenic fungi, 85-99, **2016**.
- [110] Rathore, A. S., & Gupta, R. D., Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives. *Enzyme research*, **2015**.
- [111] N. Dahiya, R. Tewari, and G. S. Hoondal, "Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 71, no. 6, pp. 773–782, **2006**.
- [112] A. S. Sahai and M. S. Manocha, "Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 11, no. 4, pp. 317–338, **1993**.
- [113] St, L., Joshi, L., Bidochka, M. J., Rizzo, N. W., & Roberts, D. W., Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(3), 907-912, **1996**.
- [114] Suresh PV, Chandrasekaran M, Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 14:655–660, **1998**.
- [115] Yuli, P. E., Suhartono, M. T., Rukayadi, Y., Hwang, J. K., & Pyun, Y. R., Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 147-153, **2004**.
- [116] Bhushan, B., Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Journal of applied microbiology*, 88(5), 800-808, **2000**.

[117] Vaidya, R., Roy, S., Macmil, S., Gandhi, S., Vyas, P., & Chhatpar, H. S., Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes xylosoxydans*. *Biotechnology letters*, 25(9), 715-717, **2003**.

[118] Kim, J. S., & Je, Y. H., A novel biopesticide production: attagel-mediated precipitation of chitinase from *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant for thermotolerance. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(5), 1639-1648, **2010**.

[119] Binod, P., Sukumaran, R. K., Shirke, S. V., Rajput, J. C., & Pandey, A., Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1845-1852, **2007**.

[120] Patil, N. S., & Jadhav, J. P., Significance of *Penicillium ochrochloron* chitinase as a biocontrol agent against pest *Helicoverpa armigera*. *Chemosphere*, 128, 231-235, **2015**.

[121] Broadway, R. M., Gongora, C., Kain, W. C., Sanderson, J. P., Monroy, J. A., Bennett, K. C., Hoffmann, M. P. Novel chitinolytic enzymes with biological activity against herbivorous insects. *Journal of Chemical Ecology*, 24(6), 985-998, **1998**.

[122] Gongora, C. E., Wang, S., Barbehenn, R. V., & Broadway, R. M., Chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus* expressed in tomato plants: effects on *Trichoplusia ni*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 99(2), 193-204, **2001**.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 20/06/2019

Tez Başlığı / Konusu: ***Beauveria bassiana* İzolatlarından Kitinaz Enzimi Eldesi ve Bazı Zararlı Böceklerle Etkisinin Araştırılması**

Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 106 sayfalık kısmına ilişkin, 20/06/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Öznur İrem Yayalar
Öğrenci No: N16122034
Anabilim Dalı: Biyoloji /Uygulamalı Biyoloji
Programı: Tezli Yüksek Lisans
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Nevin KESKİN

(Unvan, Ad Soyad, İmza)



HACETTEPE UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF SCIENCE AND ENGINEERING
THESIS/DISSERTATION ORIGINALITY REPORT

HACETTEPE UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF SCIENCE AND ENGINEERING
TO THE DEPARTMENT OF BIOLOGY

Date: 20/06/2019

Thesis Title / Topic: **Obtaining Chitinase Enzyme From *Beauveria bassiana* Isolates And The Investigation Of Its Effects On Some Pests**

According to the originality report obtained by my thesis advisor by using the *Turnitin* plagiarism detection software and by applying the filtering options stated below on 20/06/2019 for the total of 106 pages including the a) Title Page, b) Introduction, c) Main Chapters, d) Conclusion sections of my thesis entitled as above, the similarity index of my thesis is 5.... %.

Filtering options applied:

1. Bibliography/Works Cited excluded
2. Quotes excluded
3. Match size up to 5 words excluded

I declare that I have carefully read Hacettepe University Graduate School of Science and Engineering Guidelines for Obtaining and Using Thesis Originality Reports; that according to the maximum similarity index values specified in the Guidelines, my thesis does not include any form of plagiarism; that in any future detection of possible infringement of the regulations I accept all legal responsibility; and that all the information I have provided is correct to the best of my knowledge.

I respectfully submit this for approval.

Date and Signature

Name Surname: Öznur İrem Yayalar

Student No: N16122034

Department: Biology

Program: Master of Science

Status: Masters Ph.D. Integrated Ph.D.

ADVISOR APPROVAL

APPROVED.

Prof. Dr. Nevin KESKİN

(Title, Name Surname, Signature)

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Öznur İrem Yayalar

Doğum Yeri ve Tarihi: Kdz. Ereğli / 01.11.1993

E-posta: irem.yayalar@yahoo.com

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Hacettepe Üniversitesi Uygulamalı Biyoloji Anabilim Dalı

İş Deneyimi: Vitanova Bio Teknolojileri Arge Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti. –

Arge Sorumlusu

(09.01.2018-devam ediyor)

Projeler ve Poster Sunumları

European Biotechnology Congress (EUROBIOTECH), Dubrovnik, Investigation of Effect of Rose Bengal Dye to *Candida albicans* by XTT Calorimetric Assay, Poster Sunumu (2017)

Tübitak TBİGG Girişimcilik Aşamalı Destek Programı, Entomopatojen funguslardan elde edilen kitinazın biyopestisit olarak üretimi, Proje Ekip Lideri (2017)

Hacettepe BAP Koordinasyon birimi, *Beauveria bassiana* İzolatlarından Kitinaz Enzimi Eldesi ve Tarım Zararlısı Böceklerle Etkisinin Araştırılması Projesi (2018)

8. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Konya, Investigation of Determined Water Sources in Zonguldak Province for *Cryptosporidium* spp., Poster Sunumu (2018)

24. Ulusal Biyoloji Kongresi, Atık Karides Kabuklarından Elde Edilen Kitosan Maddesinin Klinik İzolatlar Üzerinde Etkisinin XTT yöntemiyle incelenmesi, Poster Sunumu (2018)