Lactobacillus coryniformis'TEN İZOLE EDİLEN KİTİNAZ ENZİMİNİN ÇİNKO OKSİT (ZnO) NANOPARTİKÜLÜNE İMMOBİLİZASYONU VE _Sitophilus zeamais_ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevda UÇAR

Yüksek Lisans Tezi

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

2021

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

Lactobacillus coryniformis'TEN İZOLE EDİLEN KİTİNAZ ENZİMİNİN ÇİNKO OKSİT (ZnO) NANOPARTİKÜLÜNE İMMOBİLİZASYONU VE *Sitophilus zeamais* ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(The Immobilization of Chitinase Enzyme Isolated from *Lactobacillus coryniformis* on Zinc oxide (ZnO) Nanoparticle and Its Effect on *Sitophilus zeamais*)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevda UÇAR

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Erzurum

Mayıs, 2021

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Lactobacillus coryniformis'TEN İZOLE EDİLEN KİTİNAZ ENZİMİNİN ÇİNKO OKSİT (ZnO) NANOPARTİKÜLÜNE İMMOBİLİZASYONU VE *Sitophilus zeamais* ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında, Sevda UÇAR tarafından hazırlanan bu çalışma, 27/05/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR *Atatürk Üniversitesi*
Danışman:	Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ *Atatürk Üniversitesi*
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ *Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi*

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK 1001 projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:118O979

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında sunulan "*Lactobacillus coryniformis*'TEN İZOLE EDİLEN KİTİNAZ ENZİMİNİN ÇİNKO OKSİT (ZnO) NANOPARTİKÜLÜNE İMMOBİLİZASYONU VE *Sitophilus zeamais* ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	**6**	**30**
Kuramsal Temeller	**3**	**30**
Materyal ve Yöntem	**15**	**35**
Bulgular	**4**	**20**
Tartışma	**13**	**20**
Tezin Geneli	**7**	**25**

Not: *Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının* ***%5'den*** *büyük olmaması gerekir.*

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	**Tez Danışmanı**
Sevda UÇAR	Prod. Dr. Neslihan DİKBAŞ
27.5.2021	27.5.2021
İmza:	İmza:

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve …… sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve …… sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

Not: Bu form, Tezin son şekline uygun olarak bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tezin sonuna eklenmelidir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim, bizi çalışmak kurtaracak mottosuyla motivasyonumu, özgüvenimi ve hayata karşı cesaretimi attıran, engin bilgi ve deneyimleri ile bu yolda bana öncü olan Danışmanım Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a,

Tez çalışmamı TOVAG 118O979 numaralı ve "*Lactobacillus coryniformis* Bakterisinden İzole Edilen Kitinaz Enziminin Çinkooksit (ZnO) Nanopartiküllerine İmmobilizasyonu ve Depo Zararlısı Mısır Biti (*Sitophilus Zeamais*)'Nin Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı 1001 projesi ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na,

Laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında, benden yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Şeyma ALIM ve Emre CANCA' ya

Hayatım boyunca takıldığım her engelde arkamda duran, sabır ve özveriyle maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen en değerli varlıklarım Ailem'e sonsuz teşekkürler.

Sevda UÇAR

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Lactobacillus coryniformis'TEN İZOLE EDİLEN KİTİNAZ ENZİMİNİN ÇİNKO OKSİT (ZnO) NANOPARTİKÜLÜNE İMMOBİLİZASYONU VE *Sitophilus zeamais* ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevda UÇAR

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Amaç Ülkemizde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan tohumluk mısırın depo şartlarında zararlılar tarafından uğradığı verim ve kalite düşüklüğünün biyoteknolojik bir yaklaşımla oluşturulan bir ürünle en aza indirilmesi planlanmıştır. Bu kapsamda depo zararlısı olarak bilinen mısır biti *Sitophilus zeamais*'ın, oluşturulacak olan nanoformülasyon ile kontrol altına alınması amaçlanmıştır.

Yöntem: *L. coryniformis*'den kitinaz enzimi, ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi ardından HiTrap Capto DEAE kolonu kullanılarak saflaştırılmış ve çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerine immobilize edilmiştir. İmmobilizasyonun varlığını kontrol etmek amacıyla, FTIR, SEM, AFM ve XRD ölçümleri yapılmıştır. 5 farklı nanoformülasyon dozu oluşturulmuş (2, 4, 6, 8, 10 mg/L) ve üç tekerrürlü olacak şekilde spreyleme yöntemiyle mısır tanelerine uygulanarak böceğin beslenirken vücuduna alması sağlanmıştır. Kontrol olarak bakteri, enzim, su, ZnO Nps ve Malathion kullanılmıştır. Uygulamanın *S. zeamais*'ın ölüm oranına ve ortalama ölüm zamanına olan etkisi tek yönlü varyans (ANOVA) analiziyle belirlenmiş ve ortalamalar arasındaki farklar %5 ihtimal seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testiyle belirlenmiştir.

Bulgular: *L. coryniformis*'den saflaştırılan enzimin moleküler kütlesi ~33 kDa, optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla pH 6.0 ve 65-75 °C olarak belirlenmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda ölüm oranı ve ortalama ölüm zamanı dikkate alındığında en iyi uygulamanın 6 mg/L olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç: *L. coryniformis* tarafından salgılanan, asidik pH ve yüksek sıcaklıkta oldukça aktif ve kararlı bir yapıda olan kitinaz enziminin ZnO nanopartiküllerine immobilizasyonu ile oluşturulan nanoformülasyonun, tahıl bitkilerinde zararlı *S. zeamais* üzerinde öldürücü etkiye ve tarımsal biyoproseslerde biyopestisit olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Lactobacillus coryniformis*, kitinaz, mısır, ZnO, Sitophilus zeamais

Mayıs 2021, 75 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

THE IMMOBILIZATION of CHITINASE ENZYME ISOLATED from *Lactobacillus coryniformis* on ZİNC OXİDE (ZnO) NANOPARTİCLE and ITS EFFECT on *Sitophilus zeamais*

Sevda UÇAR

Supervisor: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Purpose: It is planned to minimize the yield and low quality of seed corn, which is cultivated intensively in our country, by pests in storage conditions with a product created with a biotechnological approach. In this context, it is aimed to control the corn lice *Sitophilus zeamais,* known as the storage pest, with the nanoformulation to be created.

Method: The chitinase enzyme from *L. coryniformis* was purified first using ammonium sulfate precipitation and then by using the HiTrap Capto DEAE column, and immobilized on zinc oxide (ZnO) nanoparticles. FTIR, SEM, AFM, and XRD analyses were performed to analyze the presence of immobilization. Five different doses of nanoformulation (2, 4, 6, 8 and 10 mg/L) were applied to corn grains by the spraying method with three repetitions so that the insect can ingest the formulation through feeding. Bacteria, enzyme, water, ZnO Nps, and malathion were used as controls. The effect of the application on the mortality rate and mean death time of *S. zeamais* was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) and the differences between the mean values were determined by the Duncan multiple comparison test at 5% probability level.

Result: The molecular mass of the enzyme purified from *L. coryniformis* was ~ 33 kDa, and optimum pH and temperature values were determined as pH 6,0 and 65-75 ° C, respectively. As a result of statistical analysis, considering the mortality rate and mean time of death, it was concluded that the best practice was 6 mg / L.

Conclusion: It was determined that the nanobioformulation created by immobilization of the chitinase enzyme, which is secreted by *L. coryniformis* and has a very active and stable structure at acidic pH and high temperature, on ZnO nanoparticles, has a lethal effect on harmful *S. zeamais* in grain crops and has the potential to be used as a representative of biopesticides in agricultural bioprocesses. The formulation obtained as a result of the study can provide a large input in agriculture and support the economy.

Keywords: *Lactobacillus coryniformis,* chitinase, corn, ZnO, *Sitophilus zeamais*

May 2021, 75 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ x
GİRİŞ 1
KURUMSAL TEMELLER 11
MATERYAL VE METOD 19
Materyal 19
Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar 19
Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler 19
Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı 20
Metod 22
L. coryniformis'in geliştirilmesi 22
L. coryniformis'in en yüksek kitinaz aktivitesi gösterdiği gelişime aralığının belirlenmesi 22
Kitinaz enziminin AKTA Avant cihazı ile saflaştırılması 23
Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi 24
Çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerine kitinazın ımmobilizasyonu yapılarak nanoformülasyonun oluşturulması 24
Nanoformülasyonun (immobilize enzimin) karakterizasyonu 25
İmmobilize enzimin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi 26
Nanoformülasyon dozlarının uygulanması 26
ARAŞTIRMA BULGULARI 29
L.coryniformis'in Geliştirilmesi 29
Kitinaz Enziminin AKTA Avant Cihazı İle Saflaştırılması 30

FTIR Analizi 33
XRD Analizi 35
SEM Analizi 36
AFM Analizi 38
İmmobilize ve Serbest Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi 40
İmmobilize ve Serbest Kitinaz Enzimine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi 41
Nano Formülasyon Dozlarının Uygulanması 41
TARTIŞMA VE SONUÇ 48
KAYNAKÇA 52

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kısmi Saflaştırma Aralıklarına Göre Kullanılan Süpernatant ve Amonyum Sülfat Miktarları 30
Tablo 2. Uygulamaların Tekerrürlerine Göre Günlük Ölü (Ö) ve Canlı (C) Böcek Sayısı 42
Tablo 3. Uygulamalara Göre Ölüm Oranları ve Ortalama Ölüm Zamanları 47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. *S. zeamais'*ın yaşam döngüsü 2
Şekil 2. Morfolojik yapısında kitin bulunduran canlılar 4
Şekil 3. Katalitik mekanizmalarına göre kitinazların sınıflandırması 5
Şekil 4. Aktivite mekanizmasına ve katalitik bölgenin şekline göre bakteri kitinazlarının sınıflandırılması 5
Şekil 5. Enzim immobilizasyon yöntemleri 9
Şekil 6. Çalışmanın grafiksel özeti 22
Şekil 7. Böceklerin mısırda oluşturduğu zarar 27
Şekil 8. Uygulama yapılmış kavanozların görüntüsü 28
Şekil 9. MRS Agar ve MRS Broth'a inoküle edilmiş bakterilerin gelişimi 29
Şekil 10. *L. coryniformis*'in gelişme eğrisine göre en yüksek aktivite gösterdiği saat 30
Şekil 11. Amonyum sülfat çöktürme aralıklarının kitinaz enzimi aktivitesi 31
Şekil 12. AKTA Avant cihazında tüm aralıkların ve standardın çakıştırılmış grafik görüntüsü 32
Şekil 13. *L. coryniformis*'ten saflaştırılan kitinaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü 32
Şekil 14. ZnO nanopartikülünün FTIR görüntüsü 33
Şekil 15. Kitinaz Enziminin FTIR görüntüsü 34
Şekil 16. Kitinaz immobilize ZnO nanopartikülünün FTIR görüntüsü 34
Şekil 17. Saf ZnO ve kitinaz immobilize ZnO parçaıklarının XRD spektrumları 35
Şekil 18. ZnO nanopartikülünün SEM görüntüsü 37
Şekil 19. Kitinaz immobilize ZnO nanopartikülünün SEM görüntüsü 38
Şekil 20. ZnO nanopartikülünün AFM görüntüsü 39
Şekil 21. Kitinaz immobilize ZnO nanopartikülünün AFM görüntüsü 40
Şekil 22. İmmobilize ve sebest kitinaz enzimine pH'nın etkisi 40
Şekil 23. İmmobilize ve serbest kitinaz enzimine sıcaklığın etkisi 41
Şekil 24. Yedi günlük periyotlarla toplam böcek ölümlerini gösteren grafik 46
Şekil 25. Ölüm oranı ve ortalama ölüm zamanı arasındaki ilişkiyi gösteren grafik 47

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
β	: Beta
Chi	: Kitinaz
DNS	: Dinitrosalisilik Asit
GlcNAc	: N-asetilglukozamin
kDa	: Kilo dalton
Da	: Dalton
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	: Ribozomal RNA
Tris	: Tris (hydroxymethyl) aminomethane
rpm	: Dakikada devir sayısı
dk	: Dakika
sp.	: Species (tür, tekil)
U/mL	: Unit/mililitre
Vmax	: Maksimum hız
Nps	: Nanopartikül
Km	: Michaelis-Menten sabiti
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
XRD	: X Işını Kristalografisi
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu

GİRİŞ

İnsan beslenmesinde ve sağlığında önemli bir yere sahip olan hayvansal ve bitkisel kaynakların tüketimi nüfus artışı ile orantılı olarak artmaktadır. Artan besin ihtiyacının karşılanabilmesi için üretilen ürünün, tüketilene kadar uygun şekilde depolanması ve korunması esastır. Ürünün depolanma aşaması tarımsal üretimde en önemli zorunluluktur. Depolama sırasında ürünün kalitesini etkileyen birçok faktör olmakla birlikte bunların başında depo zararlısı böcekler gelmektedir. Ürüne saldıran böcekler endosperm ile beslenerek ağırlık ve kalite kayıplarına neden olurken, embriyodaki diğer besinler verimsiz tohum çimlenmesine ve canlılığın azalmasına neden olarak, ürün kalitesinin, miktarının, ticari ve agronomik değerinin büyük bir oranda azalmasına sebep olmaktadır (Stathers *et al.*, 2020).

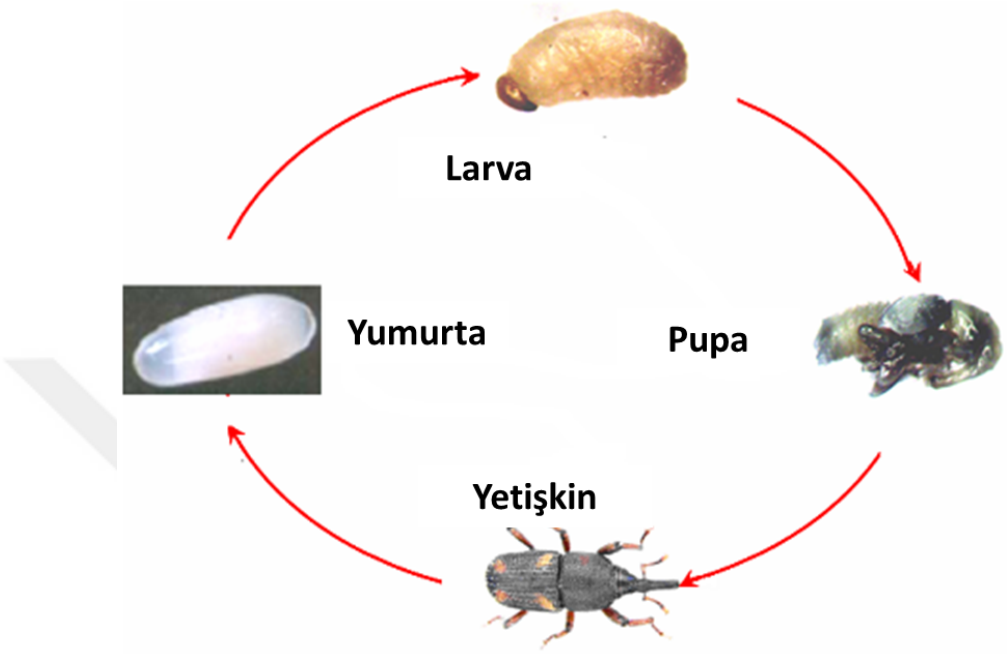
Dünya çapında önemli bir besin kaynağı olan mısır yaklaşık olarak % 10 protein, % 72 nişasta ve % 4 yağ içermektedir. İnsan beslenmesinde buğday ve çeltikten sonra en fazla kullanılan bitkilerin başında gelirken, hayvan beslenmesinde tane olarak kullanımının yanı sıra özellikle silaj yapımında kullanılan en popüler tahıl bitkisidir. Yapılan araştırmalar mısırın çok sayıda kullanım alanını ve bitkinin her parçasının ayrı bir ekonomik değere sahip olduğunu gözler önüne sermektedir (Özcan, 2009). Mısır aynı zamanda yüzlerce başka ürünün üretiminde kullanılan öncül bir hammadde olduğundan mahsul kullanımlarının sürekli genişlemesi ve çeşitlenmesi beklenmektedir (Redinbaugh and Zambrano, 2014).

Dünyada üretilen mısırın % 27'si insan beslenmesinde, % 73'ü ise hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde mısırın kullanımı hayvan beslenmesinde % 46 insan beslenmesinde ve sanayi hammaddesi olarak % 54'tür. Gelişmiş ülkelerde bu oran hayvan beslenmesinde % 90, insan beslenmesinde ve sanayi hammaddesi olarak ise % 10'dur (Özata ve Geçit, 2016; Koç ve Çalışkan, 2016). TÜİK verilerine göre ülkemizdeki mısır üretimi 6,500.000 tondur (TÜİK, 2020).

Tropikal bölgelerde mısır tane kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri böcek zararlılarının, özellikle de *S. zeamais*'ın istilasıdır. Mısır biti, *S. zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), depolanmış tahıl tanelerinin özellikle mısırın en ciddi kozmopolit zararlılarından biridir (Adarkwah *et al.*, 2012; Ojo and Omoloye, 2016).

Yetişkin mısır bitleri 3 - 3,5 mm uzunluğunda, koyu kahverengi-siyah renkli ve parlaktır. Mısır bitlerinin larvaları beyaz, etli ve bacaksızdır (Trematerra *et al.*, 2007). Her dişi yaşamı boyunca 150 kadar yumurta bırakabilir. Gelişme süresi, optimum koşullar altında

yaklaşık 35 gün iken elverişsiz koşullarda 110 güne kadar uzayabilmektedir (Şekil 1). Yumurta, larva ve pupalar, tahıllarda delinmiş tünel ve bölümlerde olduklarından normalde görülmezler. Böcek larva aşamasında tahılın iç kısımlarından beslendiğinden, istilaları erken tespit etmek zordur. Yetişkinler tahıldan çıkar ve tahıl yüzeylerinde yürürken görülebilir (Anonymous, 2021).



Şekil 1. *S. zeamais*'ın yaşam döngüsü (Meikle *et al.*, 1999)

Bu böceğin istilası tarlada başlar (Danho, 2002), ancak çoğu hasar depolama sırasında meydana gelir. Zararlı, depolanmış ürünlerde kalite ve kantite kaybına neden olmakta ve depolanan işlenmemiş mısırda ağırlık kaybı % 20-% 90 arasında değişmektedir (Giga *et al.*, 1991; Nukenine *et al.*, 2002; Muzemu *et al.*, 2013). Zararlı yalnızca tahıl tüketiminden kaynaklanan önemli kayıplara neden olmakla kalmaz aynı zamanda toksijenik türler de dahil olmak üzere küflerin büyümesini kolaylaştıran sıcaklık ve nem artışına yol açar (Bernal and Medina, 2018). Bu haşerenin neden olduğu zararlar, gıda güvenliği için de büyük bir endişe kaynağıdır (Danso *et al.*, 2017).

Depo zararlılarının kontrolünde yaygın olarak kimyasal böcek öldürücüler (insektisitler) kullanılmaktadır. Bu durum *S. zeamais* içinde geçerlidir. *S. zeamais* kontrol stratejileri temel olarak, insanlar, hayvanlar, bitkiler ve diğer hedef olmayan organizmalar için tehlikeli olabilen piretroidler, malathion ve fenitrotion gibi geleneksel insektisitlerin kullanılmasından ibarettir. İnsektisitlerin aşırı ve bilinçsiz kullanımı dirençli bireylerin seçilimine bağlı olarak dirençli popülasyonların oluşmasına yol açabilmektedir (Bravo *et al.*, 2011; Vásquez-Castro *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015). Dünya çapında 500'den fazla zararlı eklembacaklı türü bir veya daha fazla insektiside karşı dirençli hale gelmiştir (Omkar and

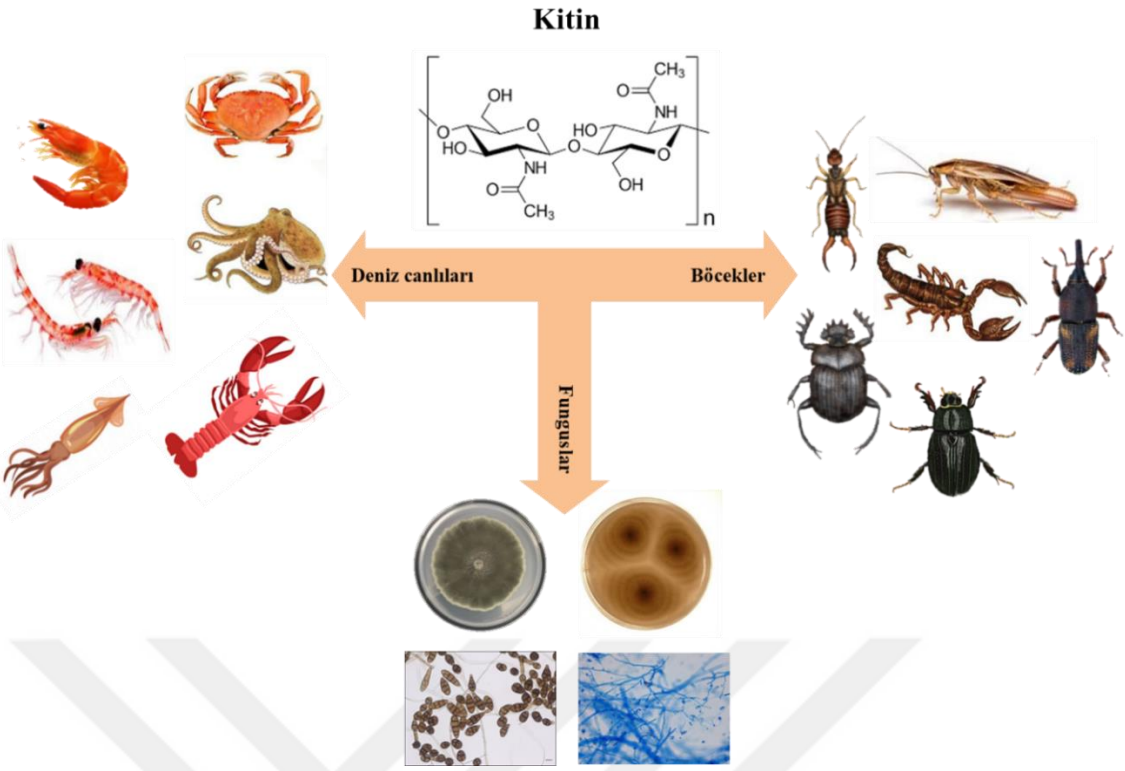
Kumar, 2016). Kullanılan kimyasalların çevreye, insan ve hayvan sağlığına verdiği potansiyel zarar nedeniyle, tarımda zararlı öldürücü bileşiklerin kullanımını değiştirmek veya azaltmak için yeni stratejiler geliştirilmektedir (Whalon *et al.,* 2008; Laznik *et al.,* 2011; Sandhu *et al.,* 2012).

Mikrobiyal biyoteknoloji, sürdürülebilir tarımın geliştirilmesi için mikroorganizmaların gelişen modern biyoteknoloji teknikleriyle farklı alanlarda (biyoprosesler, biyogübreler, biyopestisitler, vb.) uygulanmasını içeren bir biyoteknoloji dalıdır. Kimyasallara alternatif olarak yararlı mikroorganizmaların veya ürünlerinin (biyoaktif moleküller ve hidrolitik enzimler) kullanımına dayanan biyolojik kontrol, bu ajanların hedef zararlılara karşı daha iyi seçiciliği, biyolojik olarak bozunabilirliği ve azaltılmış toksisitesi ile tercih edilir (Damalas and Koutroubas, 2018).

İnsektisidal etki gösteren bakteri ve funguslar ürettikleri antibiyotikler ve salgıladıkları hidrolitik enzimlerinden (kitinazlar, proteazlar, lipazlar ve glukanazlar) dolayı biyokontrolde yaygın olarak kullanılmaktadır (Nagpure *et al.,* 2014; Köhl *et al.,* 2019). 1800'lerin sonlarından bu yana, dünya genelinde 200'den fazla istilacı böcek zararlısı ve 50'den fazla yabani ot, biyolojik kontrol yoluyla tamamen veya kısmen bastırılmıştır (Wyckhuys *et al.,* 2019).

Selülozdan sonra doğada en çok bulunan ikinci polisakkarit olan kitin, β-1,4-glikosidik bağlarla bağlanan N-asetil-D-glukosaminlerden oluşan bir polisakkarittir. Kitin, eklembacaklıların kabukları ve dış iskeletleri dahil olmak üzere birçok organizmada bulunur. Aynı zamanda, bazı mayalar da dahil olmak üzere birçok fungusun hücre duvarlarını içerir ve belirli protista ve nematod yumurtalarının yapısal çerçevelerini oluşturur (Şekil 2) (Stoykov *et al.,* 2015). Böceklerin vücut duvarlarında, peritrofik matrislerinde, tükürük bezlerinde, trakealarında, yumurta kabukları ve kas bağlantı noktalarında bulunan önemli bir bileşenidir.

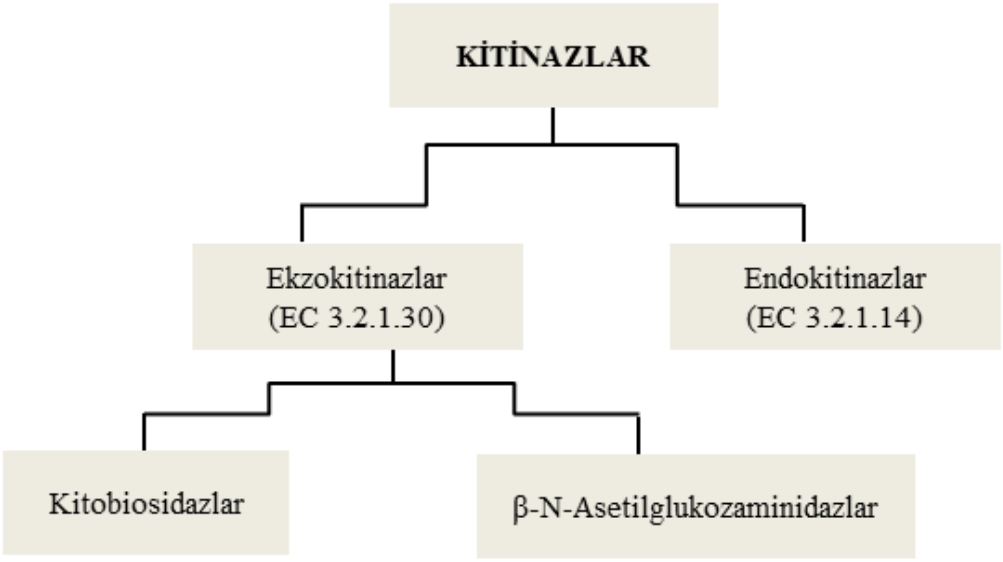
Böcek büyümesi ve morfogenez, kitin içeren yapıların yeniden şekillendirilmesine bağlıdır (Merzendorfer and Zimoch 2003; Verma and Fortunati, 2019). Kitinin bir takım mikroorganizma veya kitinolitik enzimler tarafından bozunması üzerine, dış yüzeyleri bu polimeri ihtiva eden patojenlerde ve zararlılarda ciddi hasar ve hatta ölüm meydana gelebilir. Bu bağlamda, kitinolitik mikroorganizma ve enzimler tarımsal açıdan biyokontrol ajanları ve patojen antagonistleri olarak hasat sonrası zararlıların kontrolünde ve diğer birçok biyoteknolojik uygulamada önemli bir rol oynamaktadır (Gomes *et al.,* 2000; Getha and Vikineswary, 2002; Gadelhak *et al.,* 2005; Gohel *et al.,* 2006; Melent'ev *et al.,* 2006; Prapagdee *et al.,* 2008; Sharma *et al.,* 2011; Hartl *et al.,* 2012; Nagpure *et al.,* 2014).



Şekil 2. Morfolojik yapısında kitin bulunduran canlılar

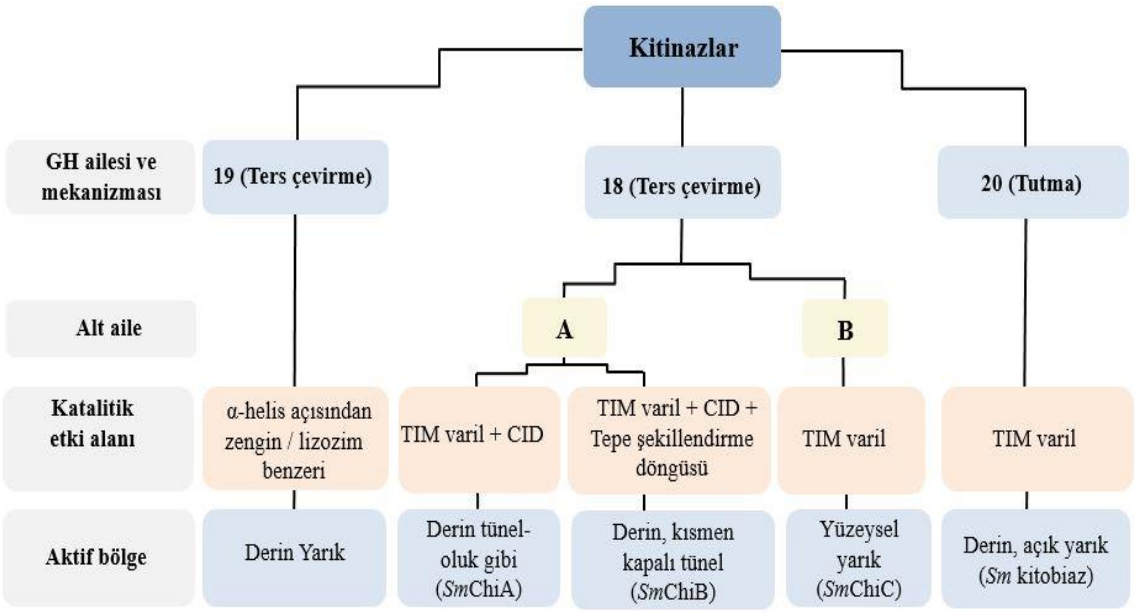
Kitin hidrolize eden enzimler, virüsler, bakteriler ve funguslar dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar, böcekler, yüksek bitkiler ve hayvanlar tarafından sentezlenir (Hamid *et al.,* 2013). Bu enzimlerden biri olan kitinazlar (E.C 3.2.2.14), boyutları yaklaşık 20 kDa ila 90 kDa arasında değişen kitin polimerini parçalayabilen glikozil hidrolazlardır (Bhattacharya *et al.,* 2007)

Kitinazlar katalitik mekanizmalarına göre endokitinazlar (EC 3.2.1.14) ve ekzokinazlar olarak sınıflandırılabilir (Şekil 3). Endokitinazlar, N-asetilglukosaminin (GlcNAc) çözünür oligomerlerini üretmek için kitinin iç zincir boyunca rastgele hidrolize olması ile karakterize edilir. Ekzokitinazlar ise kitin mikrofibrillerinin indirgeyici olmayan ucunda diasetilkitobioz salgılayan kitobiosidazlar (EC 3.2.1.29) ve GlcNAc monomerlerini üretmek için β-N-asetil glukozaminidazlar (EC 3.2.1.30) olmak üzare iki alt kategoriye ayrılmıştır (Sahai and Manocha, 1993; Hamid *et al.,* 2013). Kitinazlar, bakteriler, funguslar, mayalar, bitkiler, aktinomisetler, eklembacaklılar ve insanlar gibi çok çeşitli organizmalarda bulunurlar (Okongo *et al.,* 2019; Da Silva and Do Couto Santos, 2019).



Şekil 3. Katalitik mekanizmalarına göre kitinazların sınıflandırması

Amino asit sekansına bağlı olarak kitinolitik enzimler, CAZY veri tabanında (Lombard *et al.*, 2014), glikozil hidrolaz (GH) 18, 19 ve 20 aileleri olarak sınıflandırılır (Şekil 4). GH18, bakteri, mantar ve hayvan kitinazlarını içerirken, GH19, bitki kitinazlarından ve bazı *Streptomyces* kitinazlardan oluşur. (Hart *et al.*, 1995). GH20 ise *Vibrio harveyi*, *Dictyostelium discoideum* ve insanlardan elde edilen Beta-N-Asetil heksozaminidazdan oluşur (Dahiya *et al.*, 2006).



Şekil 4. Aktivite mekanizmasına ve katalitik bölgenin şekline göre bakteri kitinazlarının sınıflandırılması (Oyeleye and Normi, 2018)

GH18 kitinazlar genellikle bir triozfosfat izomeraz (TIM) varil $(\beta/\alpha)_8$ alanından (Umemoto *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010) oluşan bir katalitik bölge ile karakterize edilirken,

GH19 kitinazların katalitik alanı α-helis açısından zengin lizozim benzeri derin bir yarıkla karakterize edilmektedir (Kezuka *et al.,* 2006). GH18 ailesi kitinazlar, çeşitli kitin ve kitin olmayan üreticilerden karakterize edilmiştir. Bakteri, mantar ve böcek kitinazları bu ailenin çeşitli üyeleridir. Bu üyeler, gelişimsel işlevler için veya savunma mekanizmaları olarak kitini parçalamak için sinerjik olarak salgılanan oldukça verimli bir kitin hidroliz mekanizması geliştirmişlerdir (Rathore and Gupta, 2005). Bu sinerjistik özellik, dört farlı kitinolitik enzim üreten *Serratia marcescens* (Suzuki *et al.,* 2002)'de deneysel olarak kanıtlanmıştır.

Bakteriyel kitinazlar, A ve B alt ailelerine bölünür. Bu gruplar arasındaki farklılık, A alt ailesinde bulunan kitin ekleme alanından (CID) kaynaklanmaktadır. GH18 ailesi kitinaz üreten bakteriler arasında *Serratia* (Purushotham and Podile, 2012), *Vibrio* (Suginta *et al.,* 2016), *Bacillus* (Laribi-Habchi *et al.,* 2015), *Chromobacterium* (Lobo *et al.,* 2013) *ve Yersinia* (Busby *et al.,* 2012) cinsleri yer alır. GH19 ailesi kitinazlar esas olarak bitkilerden, birkaç bakteriden ve sadece bir mantardan tanımlanmıştır (Han *et al.,* 2016). Bu aile üyelerinin fungal patojenlere karşı bir savunma mekanizmasının parçası olarak üretildiği düşünülmektedir. GH20 ailesi ise gliko-konjugatlardan N-asetilglukozamin (kitobioz), terminal N-asetilgalaktozamin veya glukozaminin dimerik birimlerinin parçalanmasını katalize eden kitobiyaz ve β-N-asetil heksozaminidazı içerir (Patil *et al.,* 2000; Vaaje-Kolstad *et al.,* 2013).

Kitinaz üreten bakteriler topraktan, kabuklu deniz ürünleri atığından, bahçe ve park atık kompostundan ve kaplıcalar gibi farklı kaynaklardan izole edilmiştir. *Streptomyces, Serratia, Chromobacterium, Bacillus, Pseudomonas, Clostridium, Arthobacter, Alteromonas, Escherchia* ve *Aeromonas* dahil olmak üzere bir dizi bakteri kitinaz üretme kabiliyetine sahiptir (Bhattacharya *et al.,* 2007). Bakteriyel kitinazlarda, kitin bağlanma alanı enzimin amino veya karboksil terminal bölgelerinde bulunabilir (Watanabe *et al.,* 1994). 20-60 kDa moleküler ağırlığa sahip bakteriyel kitinazlar, böcek kitinazlarından (40-85 kDa) daha küçükken, bitki kitinazlarına (40-85 kDa) benzerdir (Bhattacharya *et al.,* 2007). İzole edildikleri bakterinin kaynağına bağlı olarak geniş bir pH ve sıcaklık aralığında aktiftir. Aynı zamanda çok çeşitli ortamlara adaptasyon, kısa üretim süreleri, yüksek enzim termostabilitesi ve genetik mühendisliğinin kolaylığı gibi avantajları nedeniyle bir dizi ticari uygulamada kullanım için umut vericidir (Veliz *et al.,* 2017).

Fungal kitinazlar, beslenme, morfogenez ve fungal gelişim süreçlerinde önemli bir rol oynadıklarından çok sayıda işleve sahiptirler (Sahai and Manocha, 1993). Fungal kitinazlar, sınıf III bitki kitinazları ile yüksek bir amino asit homolojisi gösterirler (Hayes *et al.,* 1994). Aile 18 fungal kitinazının temel yapısı, 5 alan veya bölgeden oluşur: (1) katalitik alan, (2) N-

terminal sinyal peptit bölgesi, (3) kitin bağlama alanı, (4) serin / treonin açısından zengin bölge ve (5) C-terminal genişletme bölgesi. Fungal kitinazlar; *Penicillium, Trichoderma, Mucor, Neurospora, Aspergillus, Lycoperdon, Conidiobolous* ve *Stachybotrys'*tan rapor edilmiştir (Duo-Chuan, 2006). *Tribolium castaneum, Culex pipiens* ve *Manduca sexta* gibi böceklerinde kitinaz üretebilme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Singh *et al.,* 2019).

Kitinazlar, bitkilerde; gövde, tohum, çiçek ve yumrularda yapısal olarak mevcuttur. Dokuya özgü olduğu kadar gelişimsel olarak da düzenlenirler. Bitki kitinazlarının Sınıf I, II ve IV'ü sırasıyla *Oryza sativa* (Kezuka *et al.,* 2010), *Bryum coronatum* (Taira *et al.,* 2011) ve *Picea abies* (Ubhayasekera *et al.,* 2009) kaynaklı iyi karakterize edilmiş kitinazları içeren GH 19 ailesine aittir. Bu sınıflar, kitin bağlama alanının (CBD) varlığında (sınıf I) veya yokluğunda (sınıf II) farklılık gösterir. Sınıf IV, yapılarında bazı ekstra döngülerin olmaması nedeniyle daha küçüktür (Beintema, 1994; Grover, 2012). Bitki kitinazları, fitopatojenlerin saldırısına yanıt olarak bitki öz savunmasında patogenez ile ilgili proteinler olarak veya kitooligosakkaritler veya etilen gibi büyüme düzenleyicileri ile temas yoluyla üretilir (Muzzarelli, 1996). Çevresel streslere (yüksek tuz konsantrasyonu, soğuk ve kuraklık) tepki olarak ifade edilen, embriyogenez ve etilen sentezi gibi bitkilerin hayati fizyolojik süreçlerinde yer alan bazı kitinazların varlığıda rapor edilmiştir (Fukamizo *et al.,* 2003).

Laktik asit bakterileri (LAB) fermentasyon sonucunda temel ürün olarak laktik asit oluşturan mikroorganizmalardır. Gruba dâhil edilen bakteriler genel olarak, karbonhidratların fermantasyonu sonucunda nihai ürün olarak laktik asit üreten, spor oluşturmayan, gram-pozitif çubuklar veya koklardır. Bu bakteriler, genellikle gıda fermentasyonlarında güvenli bir şekilde kullanılan mikroorganizmaları kapsamaktadır. Bununla birlikte gıda teknolojisinde: *Carnobacterium, Aerococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Oenococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Tetragenococcus, Streptococcus, Vagococcus* ve *Wegocoselcus* cinsleri ana LAB olarak kabul edilir. LAB'nin gıda işlemede yaygın kullanımı, fizyolojileri ve ürettikleri biyoaktif bileşikler hakkında büyük miktarda bilgi üretmiştir (Garsa *et al.,* 2014). Bu kullanım aynı zamanda LAB'nin güvenli (GRAS) olarak tanımlanmasıyla sonuçlanmış ve yenilebilir mahsul üretimindeki uygulamalar için maliyetli ve zaman alıcı yasal onay süreçlerinden muaf olarak herhangi bir risk oluşturmazlar (Lutz *et al.,* 2012). Artan bilimsel çalışmalar, yeni bir PGPM (Bitki Büyümesini Teşvik Eden Mikroplar) sınıfı olarak LAB'ni ikna edici bir durum haline getirmekte ve gıda üretimine yardımcı olması için biyo-gübre ve biyo-kontrol ajanları olarak kullanılabilme potansiyellerini ortaya çıkarmaktadır (Naik *et al.,* 2019).

Nanoteknoloji, sürdürülebilir ve rekabetçi tarıma katkıda bulunabilecek anahtar stratejilerden biri olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar, biyolojik maddelerin zararlılar üzerindeki etkinliğinde bir artış, insanlara ve çevreye karşı toksisitede bir düşüş ve bu maddelerin nanopartiküle immobilizasyonu ile fiziksel bozulmaya bağlı kayıpların azaldığını bildirmiştir. Bu nedenle, nanoteknoloji, uygun güvenlik profilleri, aktif ajanların stabilitesinin artması, hedef zararlılar üzerinde artan aktivite ile daha az toksik biyopestisitlerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir (Chaudhry *et al.,* 2008; Parisi *et al.,* 2015; Marchiol, 2018; Koul, 2019).

En önemli metal oksit nanopartiküllerinden biri olan çinko oksit nanoparçacıkları (ZnO NP'ler) kendine özgü fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Smijs and Pavel, 2011; Ruszkiewicz *et al.,* 2017; Ishwarya *et al.,* 2018). Çinko oksit nanopartikülleri (nano ZnO), agrega eğilimi gösterdikleri, yüksek yüzey alanı-hacim oranına ve yüksek elektron hareketliliğine sahip olduklarından dolayı immobilizasyon için elverişli koşullar yaratmaktadır (Liu *et al.,* 2005; Hooda, 2018b) Ek olarak, nano ZnO, yüksek fotostabilitesi, biyouyumluluğu, biyolojik bozunabilirliği ve kimyasal stabilitesi nedeniyle çok işlevli bir malzeme olarak sınıflandırılmıştır (Kołodziejczak-Radzimska and Jesionowski, 2014; Malini *et al.,* 2015; Chen *et al.,* 2017). ZnO, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından "GRAS" (Generally Recognized As Safe) bir madde olarak derecelendirilmektedir (Rasmussen *et al.,* 2010).

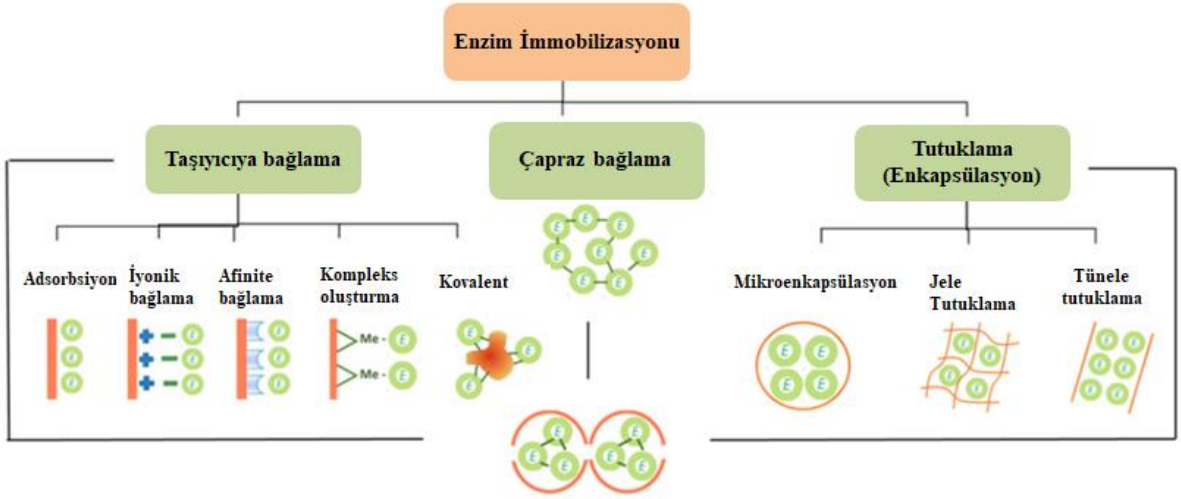
Enzimlerin geleneksel katalizörlere kıyasla kullanımındaki birçok avantaja rağmen, endüstriyel uygulamalarda kullanımlarıyla ilişkili birkaç pratik sorun vardır. Enzimler genellikle pahalıdır, bu da onların izolasyon ve saflaştırma maliyetlerinin, sıradan katalizörlerden çok daha yüksek olduğu anlamına gelmektdir. Geleneksel heterojen kimyasal katalizörlerin aksine, çoğu enzim homojen kataliz sistemlerinde suda çözünmüş olarak çalışır, bu da ürün kontaminasyonuna yol açar ve reaksiyon karışımlarının çoğundan aktif formda yeniden kullanım için geri kazanımlarını ortadan kaldırır (Homaei *et al.,* 2013).

Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için önerilen en başarılı yöntemlerden biri hareketsizleştirme stratejisinin kullanılmasıdır (Van de Velde, 2002). Hareketsizleştirme, enzimlerin katı desteklere sabitlendiği veya içinde heterojen hareketsizleştirilmiş bir enzim sistemi oluşturan teknik bir süreçtir. Enzimlerin hareketsizleştirilmiş formu, canlı hücrelerdeki (hücre iskeletine, zarına ve organel yapılarına bağlı olan) doğal modlarını taklit eder. Katı destek sistemleri genellikle enzimlerin yapısını stabilize ederek faaliyetlerini sürdürmelerini sağlar. Bu nedenle, çözelti içindeki serbest enzimlerle karşılaştırıldığında, hareketsizleştirilmiş enzimler daha sağlamdır ve çevresel değişikliklere karşı daha dirençlidir

(Kress *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2003). Ek olarak, heterojen hareketsizleştirilmiş enzim sistemleri, hem enzimlerin hem de ürünlerin kolayca geri kazanılmasına, enzimlerin birden çok yeniden kullanımına, enzimatik işlemlerin sürekli çalışmasına, reaksiyonların hızlı sonlandırılmasına ve daha çeşitli biyoreaktör tasarımlarına izin verir. (Kress *et al.*, 2002).

Enzim immobilizasyon teknolojisi, modern endüstriyel biyoteknolojinin anahtarlarından biridir. 1960'larda ilk immobilize enzimlerin ticari kullanımından bu yana, enzim immobilizasyon teknolojileri ve teorileri ile immobilizasyon malzemeleri ve kimyası hızlı bir gelişme göstermiştir. Günümüzde, farklı özel uygulamalara uyan immobilize enzimlerin tasarımı, geleneksel deneme-yanılma yaklaşımını terk etmiş ve yavaş yavaş rasyonel tasarıma geçmiştir. Enzim immobilizasyon teknolojisi, aktivite, kararlılık ve seçicilik gibi enzimlerin katalitik fonksiyonlarının iyileştirilmesinde kullanılmaktadır (Cao, 2011).

Emzim immobilizasyon yöntemleri temel olarak üzere üç ana kategoriye ayrılmaktadır (Şekil 5). Bunlar; taşıyıcıya (destek materyaline) bağlama, tutuklama (enkapsülasyon) ve çapraz bağlamadır (Vaghari *et al.*, 2016; Sheldon and van Pelt, 2013).



Şekil 5. Enzim immobilizasyon yöntemleri (Vaghari *et al.*, 2016)

Taşıyıcıya bağlamada enzim molekülünün protein yapısından yararlanılır. Molekül yüzeyindeki iyonik-fonksiyonel gruplar ve hidrofobik bölgeler bağlamada rol alırlar. (Telefoncu, 1997). Taşıyıcıya bağlama fiziksel (van der Waals ve hidrofobik etkileşimler), kovalent ya da iyonik bağlar ile gerçekleştirilebilir (Vaghari *et al.*, 2016).

Enzimlerin çapraz bağlanması, çapraz bağlı enzim kristalleri ve çapraz bağlı enzim kümeleri gibi taşıyıcı içermeyen hareketsizleştirilmiş enzimleri hazırlamak için en yaygın olarak glutaraldehit olmak üzere iki işlevli bir çapraz bağlama maddesi kullanır (Gröger *et al.*, 2001). Çapraz bağlama maddesinin moleküler ağırlığı, enziminki ile karşılaştırıldığında önemsizdir, böylece elde edilen biyokatalizör % 100 aktif enzim içerir. Bu yaklaşım,

katalizörde yüksek enzim aktivitesi ve ek (pahalı) bir taşıyıcının dışlanmasından dolayı düşük üretim maliyetleri gibi önemli avantajlar sunar. Mekanik stabilite ve kullanım kolaylığı, enzimi bir jel matris içinde veya bir taşıyıcı üzerinde çapraz bağlayan diğer yöntemler dahil edilerek geliştirilebilir (Sheldon, 2011; Vaghari *et al.*, 2016).

Tutuklama; enzimin sırasıyla poliakrilamid ve silika sol-jel gibi tipik olarak organik veya inorganik polimer matrisler içinde tutulmasıdır. Fiziksel tutuklama genellikle çok zayıftır, bu nedenle enzim kaybını önlemek için çoğunlukla kovalent bağlamanın da ek olarak kullanılması gerekmektedir (Sheldon and van Pelt 2013). Bu yöntem, enzimi tutarken substrat ve ürünlerin geçmesine izin vermektedir. Jel veya fiber içinde tutuklama ve mikro kapsülleme gibi enzim immobilizasyon metotları kullanılmaktadır. Tutuklama metodunda genellikle polimerik matriks sentezi için reaksiyon ortamında enzimin de bulunması gerekmektedir (Homaei *et al.*, 2013; Najafi *et al.*, 2014; Vaghari *et al.*, 2016). Bu yöntemi çapraz bağlama ve kovalent bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli fark, enzim molekülünün kimyasal veya fiziksel olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

Bu çalışmada; Ülkemizde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan tohumluk mısırın depo şartlarında zararlılar tarafından uğradığı verim ve kalite düşüklüğünün biyoteknolojik bir yaklaşımla oluşturulan biyolojik bir ürünle en aza indirilmesi planlanmıştır. Bu kapsamda depo zararlısı olarak bilinen mısır biti *Sitophilus zeamais*'ın gelişiminin, oluşturulacak olan nano biyoformülasyon ile kontrol altına alınması amaçlanmıştır.

KURUMSAL TEMELLER

Günümüzde enzimler yaşamın birçok alanında geniş bir uygulama alanına sahiptir. Tarım, ilaç, teşhis, kimyasal üretim, biyoyakıtlar ve tüketici ürünleri gibi çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzim destekli endüstriyel süreçler, hızlı sonuç, yüksek verimlilik, kimyasal reaksiyon özgüllüğü ve önemli ölçüde azaltılmış kirlilik gibi özelliklerinden dolayı son birkaç yıldır hızla büyümektedir (Li *et al.,* 2012; Choi *et al.,* 2015; Husain and Ullah, 2019).

Yapılan bir çalışmada, Lee *et al.* (2007) *Bacillus sp*. DAU101' den kitinaz kodlayan geni *Escherichia coli*'ye klonlamışlardır. Enzimi, GST-füzyon saflaştırma sistemini kullanarak saflaştırmış, optimum pH ve sıcaklık değerlerini sırasıyla 7,5 ve 60 ^{o}C olarak belirlemişlerdir.

Kudan and Pichyangkura (2009) kitinaz enzimini, *Bacillus licheniformis* SK-1'in kültür ortamından, kolloidal kitin afinitesi adsorpsiyonu ve ardından dietilamino etanol-selüloz kolon kromatografisini kullanarak saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin moleküler boyutu 72 kDa olarak bulunmuştur. Kitinazın, substrat olarak kolloidal kitin kullanıldığında pH 6 ve 8' de, 55 °C'de optimum etkinlik gösterdiğini belirtmişlerdir

Loni *et al.* (2014) tarafından Lonar Gölü'nün alkalin littoral toprağından izole edilen *Paenibacillus pasadenensis* NCIM 5434 bakterisinden alkalin kitinaz enzimi, amonyum sülfat çökeltmesi ve ardından DEAE selüloz kolon kromatografisi kullanılarak % 24.96 verimle 8.87 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE analizi ile moleküler karakterizasyonu yapılmış ve yaklaşık 35 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olduğu belirlenmiştir. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 10.0 ve 37 °C olarak tespit edilmiştir.

Senol vd. (2014) kitinaz enzimini *Bacillus subtilis* TV-125 izolatından amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-sefadex iyon değişim kromatografisini kullanarak saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin optimum aktivitesi, pH 4.0'da ve 50 ° C sıcaklıkta gözlenmiştir. Ek olarak, *Bacillus subtilis* TV-125A izolatının aktivitesinin % 42'sini 80 °C sıcaklıkta koruduğunu belirtmişlerdir.

Shivakumar *et al.* (2014) yaptıkları çalışamda güçlü bir biyokontrol ajanı olan *Bacillus subtilis* JN032305'ten 14 kD'lik yeni bir alkalofilik düşük moleküler kütleli kitinaz enzimini kısmen saflaştırmış ve kitinaz enziminin enzmolojisini incelemişlerdir. Enzim için optimum

sıcaklık 50 ° C ve optimum pH 9.0 olarak belirlenmiştir. Enzimin, 50 °C' de 60 dakikalık inkübasyon sırasında stabil olduğunu belirtmişlerdir.

Mohamed *et al.* (2018) termohalofilik *Melghiribacillus thermohalophilus* suşu Nari2AT gen. nov. sp. nov.'den bir hücre dışı asido-termostabil endokitinaz (ChiA-Mt45) saflaştırmış ve biyokimyasal olarak karakterize etmişlerdir. Enzimin 55 °C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra maksimum aktivitesi 9000 U / mL olarak belirlenmiştir. Isıl işlemin (20 dakika 90 °C) ardından saf enzim, hızlı performans sıvı kromatografisi (FPLC) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) üzerinde sıralı kolon kromatografileri kullanılarak elde edilmiştir. MALDI-TOF / MS analizine dayanarak saflaştırılmış enzimin moleküler kütlesi 45201.10Da, optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla pH 3.5 ve 90 °C olarak belirlenmiştir.

Bouacem *et al.* (2018) tarafından termofilik *Hydrogenophilus hirschii* suşu KB-DZ44'ten hücre dışı bir acido-termostabil endokitinaz (ChiA-Hh59) saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. 60 °C'de 36 saatlik inkübasyondan sonra kaydedilen maksimum kitinaz aktivitesi 3000U / ml olarak belirlenmiştir. Isı ve asidik işlemden sonra saf enzim, sırasıyla amonyum sülfat ve aseton ile çökeltme, ardından Sephacryl S-200 ve Mono Q-Sepharose üzerinde ardışık kolon kromatografileri kullanılarak elde edilmiştir. Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş kütle spektrometresi (MALDI-TOF / MS) analizine dayanarak, saflaştırılmış enzimin moleküler kütlesi 59103.12-Da, optimum aktivitenin gözlendiği pH ve sıcaklık değerleri ise sırasıyla pH 5.0 ve 85 °C olarak belirlenmiştir.

Yahiaoui *et al.* (2019) tarafından yeni bir hücre dışı kitinaz *Paenibacillus timonensis* suşu LK-DZ15'ten (ChiA-Pt70) izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. 30 °C'de 44 saatlik inkübasyondan sonra kaydedilen maksimum kitinaz aktivitesi 11.500 U/mL olarak belirlenmiştir. Saf enzim, amonyum sülfat çökeltmesinden (%40-70) sonra hızlı performans sıvı kromatografisi (FPLC) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) üzerinde sıralı kolon kromatografileri kullanılarak elde edilmiştir. Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş kütle spektrometresi (MALDI-TOF / MS) analizine dayanarak saflaştırılmış olan enzimin moleküler kütlesi 70.166.11 kDa olarak belirlenmiştir. pH 4.5 ve 80 ° C'de optimum aktivite elde edilmiş ve saf enzimin p-kloromercuribenzoik asit (p-CMB), 5,5'-ditio-bis-2-nitro benzoik asit (DTNB) ve N-etilmaleimid (NEM) ile tamamen inhibe edildiği belirlenmiştir.

Du *et al.* (2020) tarafından kitinaz üreten *Paenibacillus sp.*, toprak örneklerinden izole edilmiş ve kitinaz enzimi amonyum sülfat fraksiyonel çökeltme ardından DEAE 52-selüloz kolonu ve daha sonra Sephadex G-75 kolonu üzerinde kromatografi yöntemi

kullanılarak saflaştırılmıştır. Kitinazın molekül ağırlığı sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile 30 kDa olarak kaydedilmiştir. Substrat olarak koloidal kitin kullanıldığında enzimin optimum pH'sının 4.5 ve optimum sıcaklığının 50 ° C olduğu belirlenmiştir.

Enzim immobilizasyonu, enzim verimliliğini ve endüstriyel enzimatik reaksiyonlarda raf ömrünü arttırmak için yeni tekniklerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Bu gereksinimler büyük ölçekli ve ekonomik formülasyonları kolaylaştırmak için kaçınılmazdır (Barragán *et al.,* 2016).

Hooda (2018a) tarafından *Vigna mungo*'dan kitinaz ve *Canavalia ensiformis*'ten N-asetil β glukozaminidaz (NAGase) saflaştırılmış, 0.785 ± 0.01 mg / cm^2 ve konjügasyon verimi ve %96.19 ± 0.85 spesifik aktivitenin retansiyonu ile yeni poliüretan (PU) / çinko oksit nanopartiküller (nano ZnO) kompozit matrisine immobilize edilmiştir. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) yapılarak PU desteği üzerinde nano ZnO ve enzimlerin varlığı doğrulanmıştır. Böylece sentezlenen PU / nano ZnO / kitinaz / NAGaz konjügatları, pH, sıcaklık ve substrat konsantrasyonuna göre optimize edilmiş ve depolanan buğday tanelerinde kitin tayini için bir absorbans esaslı optik biyosensörün geliştirilmesi için başarıyla kullanılmıştır.

Ismail *et al.* (2019) yaptıkları çalışmada *Alternaria sp.* tarafından üretilen ekzokitinazı merkezi kompozit tasarım kullanarak istatistiksel optimizasyon ile %43' lük immobilizasyon verimi ile sakız jel boncuklarına immobilize etmişlerdir. Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi, Termal Gravimetrik analiz ve taramalı elektron mikroskobu, boncukların kademeli olarak farklı formülasyonlarını ve immobilize edilmiş olanı incelemek ve immobilizasyon işleminin başarısını teyit etmek için kullanılmıştır. İmmobilize enzimin aktivitesi, sıcaklık, pH ve substrat konsantrasyonunun etkisine göre uygun aktivasyon enerjisi (20.287 ± 0.159 kJmol−1), Km ve Vmax değerleri sırasıyla 2 mg/mL ve 5.9 U/mg protein/dak ile 60 ºC ve pH 5'te optimize edilmiştir. Ayrıca, immobilize enzim yüksek termal ve operasyonel stabiliteler göstermiştir.

Sosnowska *et al.* (2018) tarafından *Escherichia coli Rosetta* hücreleri, *Senotrophomonas maltophilia* N4'ten izole edilen kitinaz DNA dizileri ile plazmid pET-28a içeren, rekombinant kitinolitik enziminin etkin sentezi için kullanılmıştır. Çalışmanın amacı, rekombinant kitinazın tuzlar ve metal nanopartiküller (NP) ile termal stabilitesini arttırmak olarak belirtilmiştir. Enzim tarafından kolloidal kitinin hidrolizi için optimum sıcaklık 50 °C olarak belirlenmiştir. Sodyum aurotiomalat hidrat ve manganez klorür uygulaması rekombinant enzimin aktivitesini arttırmış ve kitinaz aktivitesi Gümüş nanopartiküller (Ag-

NP) kullanıldığında daha yüksek olarak belirlenmiştir. AG-NP ve Manganez Klorür üzerinde immobilize kitinazın termal stabilitesi, serbest kitinazınkinden anlamlı olarak daha yüksek ölçülmüştür. Altın ve Manganez Oksit nanopartikül uygulamasından sonra kitinazın termal stabilitesinin 50 °C'deki kontrolden daha yüksek olduğu görülmüştür.

El-shora *et al.* (2017) yaptıkarı çalışmada *Alternaria infectoria*'dan kitinazı saflaştırmayı, hareketsizleştirmeyi ve biyoteknolojik uygulamalar için biyokimyasal özelliklerini incelemeyi amaçlamışlardır. Kitinaz (EC. 3. 2. 1. 14), 51.9 U mg^{-1} spesifik aktivite ile amonyum sülfat çökeltme, DEAE-selüloz ve daha sonra Sephadex G-200 ile saflaştırılmıştır. Serbest, silika jel immobilize ve tutulan enzim için pH değerleri 7, 8 ve 9, üç kitinaz formu için optimal sıcaklıklar sırasıyla 40, 50 ve 60 ° C ve aktivasyon enerjisi değerleri 43.2, 30.8 ve 11.6 KJ mol^{-1} olarak belirlenmiştir. İmmobilize kitinaz, 8. döngüden sonra özellikle tutulan enzimden sonra kayda değer bir şekilde aktivitesini muhafaza etmiştir. Bu nedenle sonuçlar, hareketsizleştirilmiş kitinazın serbest enzime kıyasla daha yüksek termostabilite gösterdiğini ve bunun endüstriyel uygulamalar için önemli olduğunu ortaya koymuştur.

Prasad and Palanivelu (2015) yaptıkları çalışmada termofilik bir fungus olan *Thermomyces lanuginosus*'tan rekombinant, termostabil bir mantar kitinazını, glutaraldehit çapraz bağlı kitosan tanecikleri üzerine immobilize etmiş ve hareketsizleştirilmiş kitinazın özelliklerini incelemişlerdir. Hareketsizleştirilmiş enzim, daha geniş bir optimum pH sergilemiş ve çözünür enzime kıyasla alkalin pH değerlerinde daha kararlı olmuştur. Her iki enzim biçiminin de 60 °C'de optimal olarak aktif ve 3 saat boyunca 50 °C'de stabil olduğu belirlenmiştir. Üç saat sonra, çözünür enzimin aktivitesi keskin bir şekilde düşerken, hareketsizleştirilmiş kitinaz herhangi bir faaliyet kaybı olmaksızın 6 saate kadar stabil kalmıştır.

Prasad and Palanivelu (2014) tarafından*Thermomyces lanuginosus*'un rekombinant termostabil fungal kitinazı fenil Sefaroz matrisi üzerinde immobilize edilmiş ve immobilize kitinazın özellikleri incelenmiştir. Hareketsizleştirilen enzimin pH 6.0 ve 50 °C'de optimal olarak aktif olduğu ve çözünür enzimle karşılaştırıldığında asidik pH aralığında gelişmiş aktivite göstermiştir. Rekombinant termostabil immobilize enzim, aktivitesinin yaklaşık % 45'ini 6 saatten daha fazla koruyarak 50 °C'de kayda değer bir termostabilite göstermiştir. Hareketsizleştirilmiş enzimin, 4 ° C'de en az 1 ay stabil olduğu bildirilmiştir.

Mohammadzadeh *et al.* (2017) yaptıkları çalışmada, *E. coli* pET ekspresyon sistemini kullanarak yüksek ölçekli Chit36 enziminin üretimini hedeflemişlerdir. Saflaştırılmış Chit36 enziminin biyokatalitik işlem sırasında aktivitesini ve stabilitesini arttırmak için enzim Ca2 +

çapraz bağlı aljinat / sepiyolit (AlgSep) nanokompozit taneciklerinde immobilize edilmiştir. Hareketsizleştirilmiş enzimler, çözünür enzimlerden farklı optimal koşullar gerektirmiştir. Aljinat nanokompozit taneciklerinde tutulan Chit36'nın katalitik aktivitesi ve spesifik aktivitesi değerlendirilmiş ve sonuçlar, Ca-Aljinat sepiyolit kompozit boncuklarındaki (3.10 ± 0.63U / g jel) immobilize Chit36'nın aktivitesinin, Ca-aljinat boncuklarındaki (3.95 ± 0.40U / g jel) immobilize Chit36'dan daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Chit36'nın AlgSep nanokompozit taneciklerindeki (22.9 ± 1.521U / mg protein) spesifik aktivitesi, sepiyolit içermeyen aljinat taneciklerindeki (8.52 ± 0.758U / mg protein) immobilize Chit36'dan daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Hooda (2018b) tarafından iki kitinolitik enzimin hareketsizleştirilmesi için bakır oksit nanoparçacıkları olan ve olmayan yeni bir poliüretan (PU) desteği kullanılmış ve sırasıyla PU /nCuO / kitinaz / NAGaz ve PU / kitinaz / NAGaz konjügatları verecek şekilde kitinaz ve N-asetil β glukozaminidaz (NAGase) kullanılmıştır. Hareketsiz hale getirilmiş enzim konjügatlarının yüzey morfolojileri, topolojileri ve bağlı etkileşimleri, sırasıyla Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) ve Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanılarak karakterize edilmiştir.

Zararlı kontrol stratejileri çok sayıda tarımsal, çevresel ve insan sağlığı sorunu yaratmasına rağmen çoğunlukla insektisitlere bağımlıdır. Farklı bir yaklaşım ile, böcek türlerinin kütikulası büyük ölçüde kitin içerdiğinden, kitinaz üreten mikroorganizmaların zararlı kontrolünde kullanılabileceği varsayılmıştır. Bu nedenle, kitinazların üretimi, zararlılara karşı potansiyel biyokontrol ajanlarının seçiminde bir kriter olarak kullanılmıştır. Mikrobiyal kitinolitik enzimlerin kitin birikimine müdahale edebilmeleri nedeniyle birçok zararlının biyolojik kontrolünde önemli olduğu düşünülmektedir (Nagpure *et al.,* 2014).

Suganthi *et al.* (2017) tarafından *Pseudomonas fluorescens'*ten saflaştırılmış ve kısmen karakterize edilmiş kitinaz enziminin *S. zeamais*' e karşı insektisidal aktivite sahip olduğunu ve kitinaz toksisitesinin arkasındaki etki şeklinin, böcek dış iskeletinin peritrofik zarın ve bağırsak astarının ortak bir bileşeni olan kitinin enzimatik hidrolizinden kaynaklandığı vurgulanmıştır. Kitinaz salgılayan MP-13 suşu, 16S rRNA sekansına dayanarak karakterize edilmiş ve *P. fluorescens* olarak doğrulanmıştır. Çalışmada, *P. fluorescens* MP-13'ten saflaştırılmış kitinaz (0.048 birim / ml) enziminin, in vitro koşullar altında *S. zeamais* üzerinde % 100 mortalite gösterdiği berlirlenmiş ve sonuç olarak bu çalışmanın gelecekteki ürün geliştirme programları ve entegre zararlı yönetimi stratejileri için kullanılabileceği belirtilmiştir.

Rafiq *et al.* (2018) yaptıkları çalışmada *Gladiolus grandiflorus corms*'tan saflaştırdıkları endokitinazın (30 kDa) *Bemisia tabaci* (Beyaz sinek)' nin nimflerine karşı böcek toksisitesi gösterdiğini ve kontrol değerlerine kıyasla erişkinlerin ortaya çıkışında %14 azalma ve mortalite oranında % 14 artış olduğunu belirlemişlerdir. GgChi (1.5 mg) proteininin 35 gün sonra un biti popülasyonunda (*Tribolium castaneum*) önemli bir azalma gösterdiği, ancak pirinç biti (*Sitophilus oryzae*)'ne karşı daha düşük bir reaktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir.

Patil and Jadhav (2015) tarafından DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmış *Penicillium ochrochloron* kitinazı, 2000, 1000, 500, 250 ve 100 U $mL^{(-1)}$ farklı konsantrasyonlarda *Helicoverpa armigera* (Yeşil kurt)'ya karşı antifeedant (beslenmeyi engelleyici) ve büyümeyi önleyici aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Topikal olarak uygulandığında başarılı bir şekilde pupasyonu azaltmış, larva ve pupal mortaliteyi, erginlerin doza bağımlı bir şekilde ortaya çıkmasını da artırmıştır. En yüksek ölümler 2000 U mL (-1) kitinaz aktivitesi ile uygulama yapılan gruplarda kaydedilmiştir. Çalışmalar, *P. ochrochloron* kitinazın *H. armigera* larvalarının büyümesini etkileyebileceğini göstermiştir.

Mahmood *et al.* (2020) yaptıkları çalışmada *Xenorhabdus nematophila*'nın 76-kDa kitinaz proteininin klonlanmasını, ekspresyonunu ve karakterizasyonunu tarif etmişlerdir. Kitinaz genini kodlayan 1.9 kb'lik bir DNA sekansı PCR ile amplifiye edilmiş ve klonlanmıştır. Kitinaz proteini *Escherichia coli* 'de eksprese edilmiş ve afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış kitinaz proteini, yapay diyetle karıştırılmış ve larvalar bu diyetle beslendiğinde, önemli bir bitki zararlısı *Helicoverpa armigera'*nın larvalarına oral olarak toksik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, hayatta kalan larvaların büyümesi ve gelişmesi üzerinde olumsuz bir etkisi olmuştur. Hayatta kalan larvalar ağırlıklarında 9 kat azalma göstermiş ve bunun sonucunda larvaların pupalara dönüşümü olumsuz etkilenmiştir. Sonuçlar *X. nematophila*'nın kitinaz proteininin böcek öldürücü özelliğe sahip olduğunu ve bitkilerde zararlı kontrolü için güçlü bir aday olabileceğini göstermiştir.

Laribi-Habchi *et al.* (2020) tarafından *Shewanella buluşu* HE3' ten 40 kDa'lık bir kitinaz saflaştırılmış (ChiA-Si40) ve karakterize edilmiştr. Saflaştırılmış kitinaz, moleküler kütlesi 40 kDa olan homojen bir monomerdir. Substrat olarak koloidal kitin kullanıldığında, en iyi aktivite pH 4'te ve 70 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Katalitik etkinliği (kcat / Km), bazı bakteriyel GH18 kitinazlarından ve ticari enzim Chitodextrinase®'den daha üstün olarak belirlenmiştir. ChiA-Si40'ın buğday biti *Sitophilus granarius*'a karşı biyolojik analizi, etkin bir böcek öldürücü etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Buğday biti ChiA-Si40 ile temasa girdikten 1 saat sonra yaklaşık %10 ile % 100 mortalite oranları elde edilmiştir. Histolojik

çalışma, larva orta bağırsak, peritrofik membran ve epitel hücrelerinin ChiA-Si40 uygulamasından sonra önemli ölçüde etkilendiğini açıkça göstermiştir. Bu özelliklerin ChiA-Si40'ı Cezayir'de depolanan tahılların böcek zararlıları arasında popüler olan *S. granarius*'un biyolojik kontrolü için potansiyel bir biyo-insektisit ajan haline getireceği belirtilmiştir.

Jameel *et al.* (2020) tiyametoksam nanokompozitli ZnO nanoparçacıkları (NP'ler) sentezlemiş ve *Spodoptera litura* (Pamuk yaprak kurdu)'nın (Lepidoptera: Noctuidae) larvaları üzerindeki sinerjistik etkilerini araştırmıştır. Bu larvaların ZnO NP'lerin bileşiminde tiyametoksam (10-90 mg / L) ve tiyametoksam emdirilmiş hint yaprakları ile beslenmesine izin verilmiştir. Gözlemler artmış larva mortalitesi (% 27 artmış mortalite), pupa ve erginlerde bir malformasyon ve düşük doğurganlık göstermiştir. Tedavi edilen larvalarda süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST) ve tiyobarbitürik aside reaktif maddeler (TBARS) gibi biyokimyasal parametrelerde önemli bir doza bağlı varyasyon gözlenmiştir. SOD ve GST aktivitesinde sırasıyla % 72.42 ve % 33.82'lik bir düşüş, kontrole kıyasla daha yüksek konsantrasyonda gözlenmiştir. Sentezlenmiş nanokompozit, X-ışını kırınımı (ortalama kristalin boyutu 34 nm), taramalı elektron mikroskopisi, transmisyon elektron mikroskopisi (ortalama parçacık boyutu 30 nm) ve Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (Zn-O germe tepeleri) gibi farklı biyofiziksel tekniklerle karakterize edilmiştir (432 cm^{-1} ve 503 cm^{-1}).

Khooshe-Bast (2016) tarafından sentezlenmiş çinko oksit nanopartiküllerinin (ZnO NPs) ve *Beauveria bassiana* TS11' in *Trialeurodes vaporariorum* (Sera beyaz sineği) *erginleri* üzerindeki etkileri incelenmiştir. ZnO NPs çöktürme yöntemi ile sentezlenmiş ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleri, ZnO Np'lerin eşit olarak sıkıştırılmadığını göstermiştir. X-ışını kırınımı sonuçları, ZnO Nps'nin altıgen wurtzit yapısını doğrulamıştır. Fourier dönüşümü Kızılötesi analizi, Zn-O bağı ile ilgili 434-555 cm^{-1} aralığında yoğun bir emilim zirvesi göstermiştir. Biyolojik sonuçlarda, yetişkinler farklı konsantrasyonlarda ZnO NP'lere (3, 5, 10, 15, 20 mg l-1) ve funguslara (104, 105, 106, 107, 108 spor ml-1) maruz bırakılmıştır. ZnO NPs ve funguslar için Lc_{50} değerleri sırasıyla 7.35 mg L^{-1} ve 3.28×105 spor ml^{-1} olarak belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyonda ZnO NPs ve mantarlarla elde edilen mortalite oranları sırasıyla %91.6 ve %88.8 olarak belirlenmiştir. ZnO NPs ve *B. bassiana* Ts11'in yetişkinlerde olumlu bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Rouhani *et al.* (2012) tarafından Ag ve Ag-Zn nano partiküllerinin *Aphis nerii'*ye karşı insektisidal aktivitesi araştırılmıştır. Ag ve Ag-Zn nanoparçacıkları, bir solvotermal yöntemle sentezlenmiş ve bu nano parçacıklar kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda böcek öldürücü çözeltiler hazırlanmış ve *A. nerii* üzerinde test edilmiştir. Karşılaştırma amacıyla geleneksel

bir insektisit olarak imidakloprid kullanılmıştır. Deneylerde, imidakloprid, Ag ve Ag-Zn nanopartikülleri için Lc_{50} değerinin, sırasıyla 0.13 uL mL^{-1}, 424.67 mg mL^{-1} ve 539.46 mg mL^{-1} olduğu hesaplanmıştır. Ag nanoparçacıklarının *A. nerii'*nin zararlı yönetimi programlarında değerli bir araç olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ek olarak 1 uL mL^{-1}'deki imidakloprid ve 700 mg mL^{-1}'deki nanopartiküllerin en yüksek böcek öldürücü etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

Salem *et al.* (2015) tarafından iki nanoparçacık, alüminyum oksit (AI_2O_3) ve Çinko oksit (ZnO), standart referans olarak Malathion'a kıyasla depolanmış ürünlerde böcek koruyucu olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Malathion'un *Tribolium castaneum* erginlerinde mortalite ve larvalarında ağırlık kaybı yüzdesi üzerinde çalışılan tüm parametrelerde en yüksek olumsuz etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Elde edilen veriler konsantrasyonun ve maruz kalma süresinin artmasının mortalitede artışa (%) ve ağırlık kaybında (%) azalmaya neden olduğunu göstermiştir. ZnO, Al_20_3 nanoparçacıklarına kıyasla daha fazla etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Son olarak, Malathion önde olmakla birlikte, bu çalışma, sentetik böcek ilacı ile karşılaştırıldığında insanlar için güvenli olduğu düşünülen insektisitlere alternatif olarak entegre zararlı yönetimi programlarında Al_2O_3 ve ZnO nanopartiküllerinin kullanılmasını önermektedir.

MATERYAL VE METOD

Materyal

Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar

- ✓ Steril Kabin (ESCO Class 2 Nuaıre 425-500E)
- ✓ Steril Öze (ORLAB)
- ✓ 15 ml'lik Cam Tüpler (TEKNİK CAM SANAYİ)
- ✓ 40 ml'lik Cam Tüpler (TEKNİK CAM SANAYİ)
- ✓ 15 ml'lik Ependorf Tüpler (ISOLAB)
- ✓ 50 ml'lik Ependorf Tüpler (ISOLAB)
- ✓ Plastik Petri Plakları (ISOLAB)
- ✓ Etüv (MEMMERT)
- ✓ UV- Spektrofotometre (SHIMADZU UV-1800 UV-VIV)
- ✓ Santifrüf Cihazı (BECKMAN COULTER)
- ✓ Isıtmalı Magnetik Karıştırıcı **(**HEIDOLPH MR HEI STANDART)
- ✓ Buzdolabı (ARÇELİK)
- ✓ Cam Erlen (250 ml) (ISOLAB)
- ✓ Cam Beher (250 ml) (ISOLAB)
- ✓ pH Metre (METTLER TOLEDO)
- ✓ Hassas Terazi (SHIMADZU)
- ✓ Otoklav (HİCLAVE HV-50 L)
- ✓ Kar Makinesi (SCOTSMAN)
- ✓ Otomatik Pipet (1 ml) (EPPENDORF)
- ✓ Saf Su Cihazı (DIRECT-Q)
- ✓ Su Banyosu (TERMAL)
- ✓ Vorteks (IKA MS-3)
- ✓ Cam Kavanoz (TEKNİK CAM SANAYİ)
- ✓ Alüminyum Folyo (ISOLAB)

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

- ✓ MRS Broth (Oxoid)
- ✓ MRS Agar (Oxoid)
- ✓ Kitinaz Enzimi (MERCK)

- ✓ Hidroklorik Asit (HCl) (ISOLAB)
- ✓ Sodyum Hidroksit (NaOH) (SIGMA-ALDRICH)
- ✓ Sodyum Klorür (SIGMA-ALDRICH)
- ✓ 3,5-dinitrosalisilik asit (SIGMA-ALFRICH)
- ✓ Kitin (SIGMA-ALDRICH)
- ✓ Amonyum Sülfat $(NH_4)_2SO_4$) (ISOLAB)
- ✓ Sodyum Sitrat ($C_6H_5Na_3O_7$) (ISOLAB)
- ✓ Sodyum Asetat ($C_2H_3NaO_2$) (ISOLAB)
- ✓ Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (ISOLAB)
- ✓ Trizma base (MERCK)
- ✓ Sülfirik Asit (H_2SO_4) (ISOLAB)
- ✓ Amonyum Molibdat ((NH4)6Mo7O24.4H2O) (SIGMA-ALDRICH)
- ✓ Demir Sülfat (FeSO4) (SIGMA-ALDRICH)
- ✓ Çinko oksit (ZnONps) (SIGMA-ALDRICH)
- ✓ Malathion (MERCK)
- ✓ Potasyum Bromür (KBr) (MERCK)
- ✓ Glisin (MERCK)
- ✓ Tris base (MERCK)
- ✓ SDS (MERCK)
- ✓ Oriole Floresan Jel Boyası (Bio-Rad)

Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

%70'lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün (Sigma) üzerine hacmi 100 ml oluncaya kadar saf su eklenmiştir.

MRS Agar: Hassas terazide tartılan 68,2g MRS Agar hazır haldeki ılık 1 L dH2O içerisine ilave edilerek çözünene kadar karıştırılmıştır. Sterilizasyon işlemi için 121ºC'de 15 dk otoklavlanmıştır.

MRS Broth: Hassas terazide tartılan 51 g MRS Broth hazır haldeki ılık 1 L dH2O içerisine ilave edilerek çözünene kadar karıştırılmıştır. Sterilizasyon işlemi için 121ºC'de 15 dk otoklavlanmıştır.

10x Tris Glisin SDS tamponu (1L için): 144 gr Glisin, 30,2 gr Tris base, 20 gr SDS tartılır ve 900 ml ddH2O'da çözülür. 10x konsantrasyonda hazırlanan tampon çözelti yürütme aşamasında 1x konsantrasyona seyreltildikten sonra kullanılmıştır.

0,1 M Sodyum asetat tamponu (pH 2,0-6,0): 0,82 g sodyum asetat tartılmış 60 ml dH_2O ile çözdürülmüş ve pH ayarlaması yapıldıktan sonra dH_2O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. pH değerlerini ayarlayabilmek için 0,1 M'lık HCI kullanılmıştır.

10 Mm Tris-HCl tamponu (pH 7,0-10): 0,121 g Trizma base tartılmış 60 ml dH2O ile çözdürülmüş ve pH ayarlaması yapıldıktan sonra dH2O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Uygun pH değerini ayarlamak için konsantre HCl kullanılmıştır.

Karbonat tamponu (pH 10,0-11,0): 0,105 g sodyum karbonat tartılmış ve 100 ml distile su ile üzeri tamamlanmıştır. pH değerlerini ayarlamak için 0,1 M'lık NaOH kullanılmıştır.

0,02 M Sodyum sitrat tamponu: 5,88 g Sodyum sitrat tartılıp, 60 ml distile su içerisinde çözdürülmüş, pH 6,0'a ayarlanmış ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

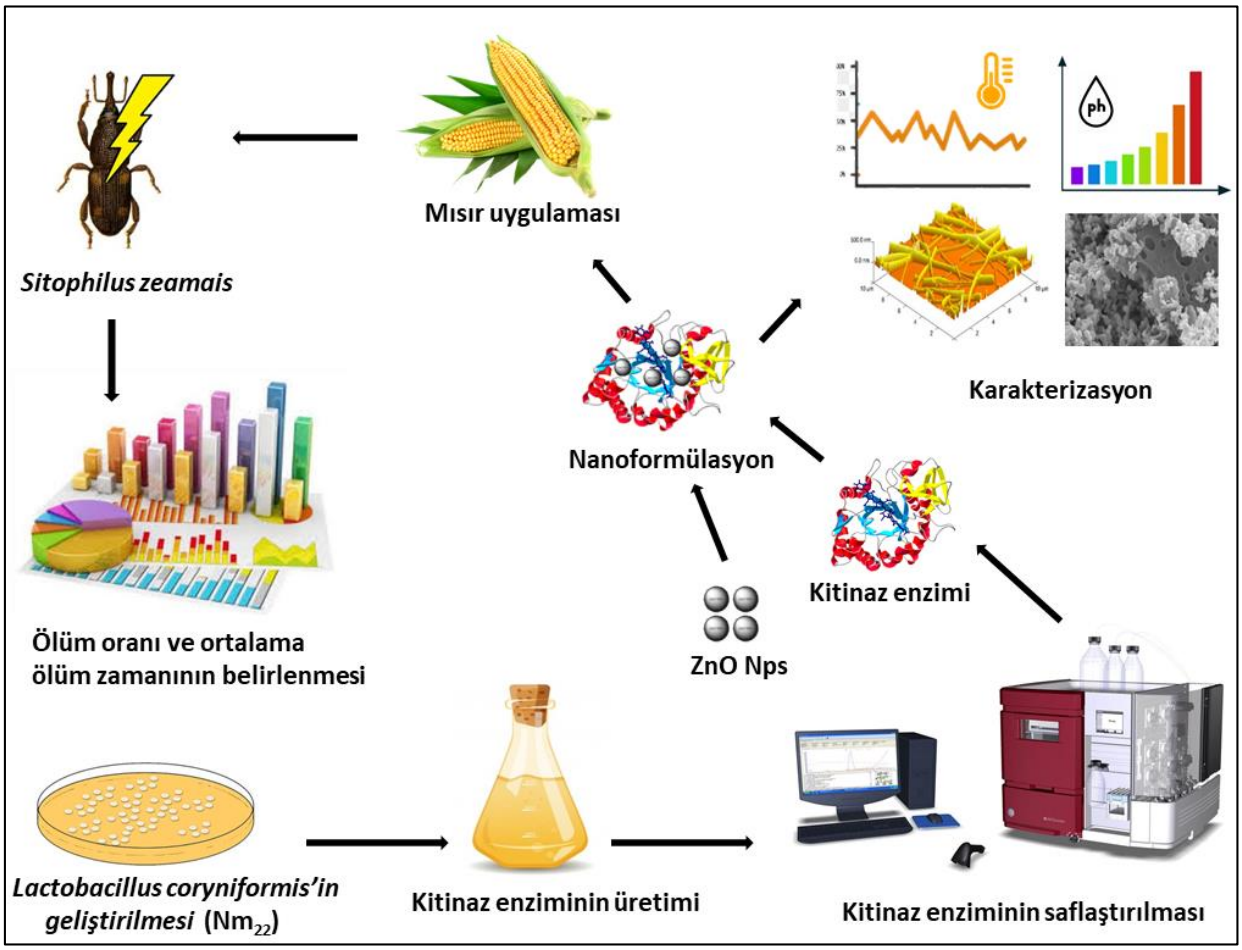
Kollodial kitin: 5 g kitinin üzerine 75 mL konsantre HCl çözeltisi ilave edilmiş ve ısıtmalı manyetik karıştırıda 30°C'de 1 saat karıştırılmıştır. Çökeltinin pH değeri 7'ye ulaşıncaya kadar 2-3 L 4 °C'lik distile su ile yıkanmış ve her yıkamadan sonra 10.000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir (Lisa et al. 2017).

Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat: 0,02 M Sodyum sitrat çözeltisine kollodial kitin (%0,05'lik) eklenerek hazırlanmıştır.

0,01 M DNS (Renklendirme) çözeltisi: 0,228 gr 3,5-dinitrosalisilik asit 100 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Metod

Metod kısmının anlaşılır olması amacıyla tez kapsamında yapılmış olan çalışmalar grafiksel özet olarak Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. Çalışmanın grafiksel özeti

L. coryniformis'in geliştirilmesi

Stok kültürden bir öze yardımıyla bakteri alınıp MRS agar'a ekilerek 35 °C'de 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. MRS Agar'da gelişme gösteren bakteriler (bir öze dolusu) MRS Broth'a inoküle edilerek bakterilerin sıvı kültür ortamına aktarılması sağlanmıştır. 35 °C'de 120 saat etüvde inkübasyona bırakılmış, oluşan koloniler sayılarak (kob/ml olarak) hesaplama yapılmıştır. (Collins *et al.*, 1995; Magnusson and Schnürer, 2001).

L. coryniformis'in en yüksek kitinaz aktivitesi gösterdiği gelişime aralığının belirlenmesi

L. coryniformis'in en yüksek kitinaz aktivitesi gösterdiği gelişme aralığını belirlemek için *L. coryniformis* MRS Broth (5 g/L kollodial kitin)'a inoküle edilerek 35 °C'de inkübasyona bırakılmış ve her 6 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda

bakterinin optimum enzim aktivitesi gösterdiği gelişme aralığı belirlenmiştir (Ong *et al*., 2017).

Enzim aktivitesinin ölçülmesi

200 µL enzim, 500 µL substrat çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika 37 °C'ye ayarlanmış benmaride reaksiyona sokulmuştur. Su banyosundan alınan tüplere 750 µL renklendirme çözeltisi ilave edildikten sonra 10 dk 80 °C'ye ayarlı su banyosunda bekletilerek reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Su banyosundan çıkarılan örneklere 1300 µL distile saf su eklenmiştir. Örnekler köre (500 µL substrat +750 µL renklendirme çözeltisi + 1500 µL saf su) karşı 540 nm'de spektrofotometrede ölçülmüş ve aktiviteleri belirlenmiştir (Vaidya *et al.,* 2003). Örneklerdeki N-asetil Glukozamin miktarını belirlemek için, GlcNAc çözeltisi hazırlanarak bir standart grafik oluşturulmuştur. DNS metoduyla çözeltinin 540 nm de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen grafik kitinaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Kitinaz enziminin AKTA Avant cihazı ile saflaştırılması

MRS Agarda gelişen bakteriler, hazırlanmış olan MRS Broth (5 g/L kollodial kitin)'a inoküle edilerek bakterilerin sıvı kültür ortamına aktarılması sağlanmıştır. 35 °C'de 48 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra +4 °C'de 48 saat tutulmuştur. 9000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant (üst faz) ve pelet ayrılmıştır. Santrifüjleme sonrası pelet atılmış ve süpernatant ile sonraki işlemlere devam edilmiştir. Enzimin çöktüğü doygunluk aralığını belirlemek için gerekli olan amonyum sülfat oranı aşağıda verilen formül ile belirlenmiştir.

$G\ (NH_4)_2SO_4 = 1.77 \times V \times (S2 - S1) / (3.54 - S2)$

G $(NH4)_2SO_4$: Eklenmesi gereken katı amonyum sülfat tuzunun gram miktarı

V: Enzim çözeltisinin (süpernatant) hacmi

S1: Başlangıçtaki amonyum sülfat doygunluğu (1'in kesri olarak)

S2: İstenen amonyum sülfat doygunluğu (1'in kesri olarak)

%0-20 aralığı için, gerekli olan amonyum sülfat tartılarak ve +4°C'de manyetik karıştırıcıda yavaşça enzim çözeltisine ilave ilave edilmiştir. Daha sonra 9000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelti, pH'sı 7,0 olan 0,1 M Tris tamponunda çözülmüştür. Aktivite analizleri için +4°C'de saklanmıştır (Bu işlem; 20-40, 40-60, 60-80 aralıkları için tek tek yapılmıştır). Enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık kitinaz enziminin amonyum sülfat doygunluk aralığı olarak tespit edilmiştir.

*L. coryniformis'*ten üretilen kitinaz enziminin saflaştırılması için GE Akta Avant cihazı kullanılmıştır. Cihazda inhouse olarak optimize edilen metodun cihaz parametreleri Tablo 2'de verilmiştir. Akta Avant cihazında desalting kolon kullanılarak tuzların uzaklaştırılma işlemi yapılmıştır. Daha sonra pik görülen aralıklar toplanmış ve Annion Exchange Chromatography metoduyla HiTrap Capto DEAE kolonu kullanılarak kitinaz enzimi saflaştırılmıştır (Xi *et al.,* 2018). Cihazda internal standart olarak SİGMA Synonym: Chitodextrinase (CAS Number: 9001-06-3) kullanılmıştır.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Elektroforez, 90 dakika boyunca 20 mA / jel sabit akımında tris-glisin-SDS çalışma tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir. % 4 istifleme ve % 10 çözme jeli kullanarak (Laemmli, 1970). Koşu tamamlandıktan sonra proteinler, oriole ile boyanmış ve elektrofortogramlar, jel analiz yazılımı ile analiz edilmiştir.

Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi

% 0.05 kollodial kitin içeren substrat çözeltileri, farklı pH değerlerine (pH 2.0-11.0) sahip tamponlar kullanılarak hazırlanmıştır. pH ayarlaması için Sodyum asetat (pH 2.0-3.0), Sodyum sitrat (pH 4.0-6.0), Tris (pH 7.0-9.0) ve Sodyum karbonat (pH 10.0-11.0) tamponları kullanılmıştır. Spektrofotometrede (540 nm'de) absorbans değerleri ölçülmüş ve enzimin optimum pH aralığı belirlenmiştir (Sarıbuga *et al.,* 2014).

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek için 10-90 °C aralığında sıcaklık 10 °C arttırılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sıcaklıkları su banyosunda ayarlanmıştır. Absorbanslar 540 nm de ölçülerek enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri belirlenmiştir (Sarıbuga *et al.,* 2014)

Çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerine kitinazın ımmobilizasyonu yapılarak nanoformülasyonun oluşturulması

Sigmadan hazır olarak satın alınan Çinko oksit nanopartiküllerine kitinaz enziminin adsorpsiyon yoluyla immobilizasyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Bunun için 100 mg/l olacak şekilde hazırlanan ZnO nanopartiküllerinden 3 ml, kitinaz enziminden 1 ml alınarak 2 saat boyunca 100 rpm hızda manyetik karıştırıcıda karıştırılarak enzimin nanopartiküle immobilizasyonu sağlanmıştır (Chen and Chang, 1994; Hooda, 2014).

Nanoformülasyonun (immobilize enzimin) karakterizasyonu

İmmobilize kitinaz enziminin karakterizasyonu için FTIR, XRD, AFM ve SEM kullanılmıştır. Analizler Atatürk Üniversitesi bünyesinde Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Merkezi'nde (DAYTAM) yapılmıştır.

FTIR analizi

FTIR tekniği, saf maddeleri, karışımları, safsızlıkları ve çeşitli materyallerin bileşimlerini tanımlamak için kullanılmaktadır (Kowalczuk and Pitucha, 2019). ZnO Nanopartikülü ve ZnO Nanopartikülüne bağlı Kitinaz enziminin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Varian FTS 7000, ADB) kullanılarak elde edilmiştir. Örnekler (0,1 g), KBr (0,1g) ile homojen olarak karıştırılarak pelet haline getirilmiş ve FTIR spektrumu çekilmiştir.

XRD analizi

X-ışını kırınım analizi (XRD), polimerlerin kristalliğinin belirlenmesi, kristal fazların tanınması (polimorfizm) için kullanılan mikroyapısal analiz yöntemlerinden biridir (Inan, 2017). ZnO Nanopartikülü ve ZnO Nanopartikülüne immobilize Kitinaz enziminin XRD paterni dalga boyu 1,5405 Å olan CuKα ışın kaynaklı Rigaku D-max 2200 X-ışını difraktometresi kullanılarak 4 derece/dakika tarama hızı ve 0,01 derece tarama adımı ile 2θ =10-80° açısı aralığında alınmıştır.

SEM analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) genellikle polimerik malzemelerin yüzey morfolojisini araştırmak için kullanılmaktadır (Sinha Ray, 2013). SEM, partikül boyutunu, şeklini ve dokusunu belirlemek için yalnızca miligram miktarlarda malzemenin kullanılabileceği bir tekniktir. SEM'de, ince bir elektron demeti, bir dizi paralel izde hazırlanan numuneyi tarar. Elektronlar numune ile etkileşime girer ve bir katot ışın tüpünün ekranında algılanabilen ve görüntülenebilen farklı sinyaller üretir (Amidon, 2017). Kullanılan ZnO Nanopartikülünün ve ZnO Nanopartikülüne immobilize Kitinaz enziminin yüzey morfolojisini ve yapısını değerlendirmek amacıyla Phillips XL-305 FEG cihazı ile SEM görüntüleri elde edilmiştir (Kasthuri *et al.*, 2007; Micheva and Smith, 2007).

AFM analizi

AFM, mikro / nanoyapılı malzemeleri karakterize etmek için kullanılan etkili bir yüzey analizi tekniğidir. Bu esnek teknik, yüksek çözünürlüklü nano ölçekli üç boyutlu

görüntüler elde etmek için kullanılabilir. Boyut, morfoloji, yüzey dokusu ve pürüzlülük dahil birçok fiziksel özellik hakkında hem kalitatif hem de kantitatif bilgi sunmaktadır. Aynı taramada 1 nm'den 8 μm'ye kadar geniş bir partikül boyutu aralığı karakterize edilebilmektedir (Farré and Barceló, 2012; Aliofkhazraei and Ali, 2014). İmmobilize enzimin yapısını değerlendirmek amacıyla Hitachi 5100N cihazı ile AFM görüntüleri elde edilmiştir

İmmobilize enzimin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi

Optimum pH'yı belirlemek için % 0.05 kollodial kitin içeren substrat çözeltileri, Sodium asetat (pH 2,0-3,0), Sodium sitrat (pH 4,0-6,0), Tris-HCl (pH 7,0-9,0) ve Sodium karbonat (pH 10,0-11,0) tamponları kullanılarak farklı pH değerlerine ayarlanmıştır. Spektrofotometrede 540 nm de absorbans ölçümleri yapılarak enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri belirlenmiştir (Sarıbuga *et al.,* 2014; Prasad and Palanivelu 2015; Sachdeva and Hooda 2016).

Termal stabiliteyi belirlemek için immobilize enzim 10 ºC aralıklarla 15-85 ºC arasındaki sıcaklıklara maruz bırakılmış ve enzim aktivitesi ölçülmüştür. İmmobilize enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri belirlenmiştir (Prasad and Palanivelu, 2015; Sachdeva and Hooda, 2016).

Nanoformülasyon dozlarının uygulanması

Sitophilus zeamais ergin bireyleri Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden (pupa dönemini yeni tamamlamış olarak) temin edilmiştir. Temin edilen böceklerin mısırda oluşturduğu zarar Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. Böceklerin mısırda oluşturduğu zarar

Deneme Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın Ambarlarda Zararlı Böcekler Koruyucu Standart İlaç Deneme Metoduna göre tesadüf parselleri deneme desenine göre yürütülmüştür. Buna göre her birinin içerisine 50 gr mısır tanesi gelecek şekilde 250 cm^3'lük cam kavanozlara 5 farklı nanoformülasyon dozu (2, 4, 6, 8, 10 mg/L) sprey yapılarak uygulamıştır. Kontrol grubu olarak enzim, bakteri, ZnO ve su uygulanmıştır. Uygulama her bir doz için 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Nano-İnsektisitin mısır tanelerine uygulanmasından 24 saat sonra her bir kavonoza 25'er adet (kontrol dâhil) 1-7 günlük test böcekleri bırakılmıştır (25x10x3). Bu kavanozlar etiketleri ile birlikte (25±1 °C -% 60 ± % 5) laboratuvara yerleştirilmiştir. Bu şekilde yerleştirilen örnekler her gün kontrol edilerek zamana bağlı olarak ölü ve canlı böceklerin sayıları hazırlanan tablolara kaydedilmiştir. Yirmi sekiz gün boyunca aynı saatte sayımlar yapılmıştır (Anonim, 2020). *S. zeamais* laboratuvar koşullarında (25-28 °C, % 60-70 nem ve 12 saat karanlık 12 saat ışık) yumurtadan ergin oluncaya kadar geçen süre 34,7 gün olarak belirlenmiştir (Ojo and Omoloye, 2016). *S. zeamais* ile mücadelede tavsiye edilen Malathion 25 %'in önerilen konsantrasyonu (10 ml ilaç+1 lt su / 1 ton ürün) 50 gr ürün için hesaplanarak mısır taneleri üzerine sprey edilmiş, uygulamadan 24 saat sonra kavanoz içerisine erginler bırakılmış ve uygulamaların görüntüsü Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. Uygulama yapılmış kavanozların görüntüsü

ARAŞTIRMA BULGULARI

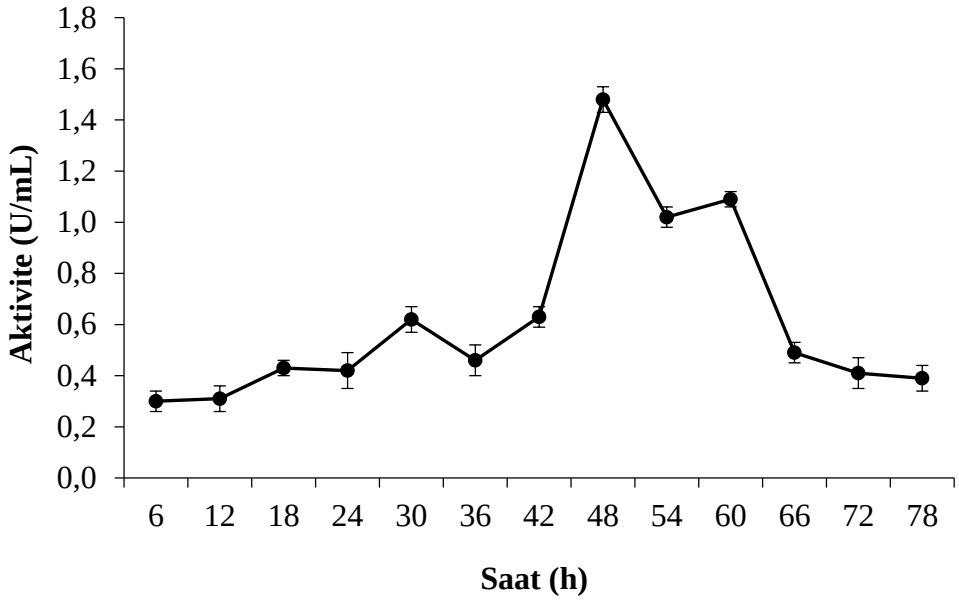
L.coryniformis'in Geliştirilmesi

Ekim yapılan bakterilere ait görüntüler Şekil 9' da verilmiştir.



Şekil 9. MRS Agar ve MRS Broth'a inoküle edilmiş bakterilerin gelişimi

L. coryniformis'in en yüksek aktivite gösterdiği gelişim aralığını belirlemek için bakterinin her 6 saatte bir enzim aktivitesi ölçülmüş ve ölçümler sonucunda bakterinin en yüksek aktiviteyi 2. günün sonunda (48 saat) 1,48 U/mL olarak gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 10). Enzim saflaştırma işlemlerine 48 saat inkübasyona bırakılan bakteriden devam edilmiştir.



Şekil 10. *L. coryniformis*'in gelişme eğrisine göre en yüksek aktivite gösterdiği saat

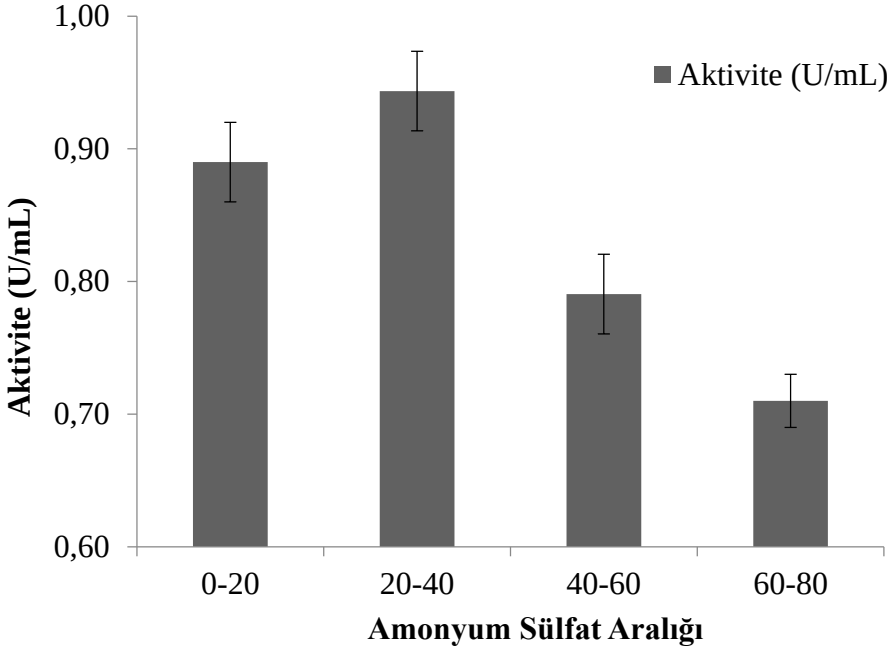
Kitinaz Enziminin AKTA Avant Cihazı İle Saflaştırılması

Enzimin çöktüğü amonyum sülfat doygunluk aralığını belirlemek için gerekli olan amonyum sülfat miktarları belirlenmiş ve Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Kısmi Saflaştırma Aralıklarına Göre Kullanılan Süpernatant ve Amonyum Sülfat Miktarları

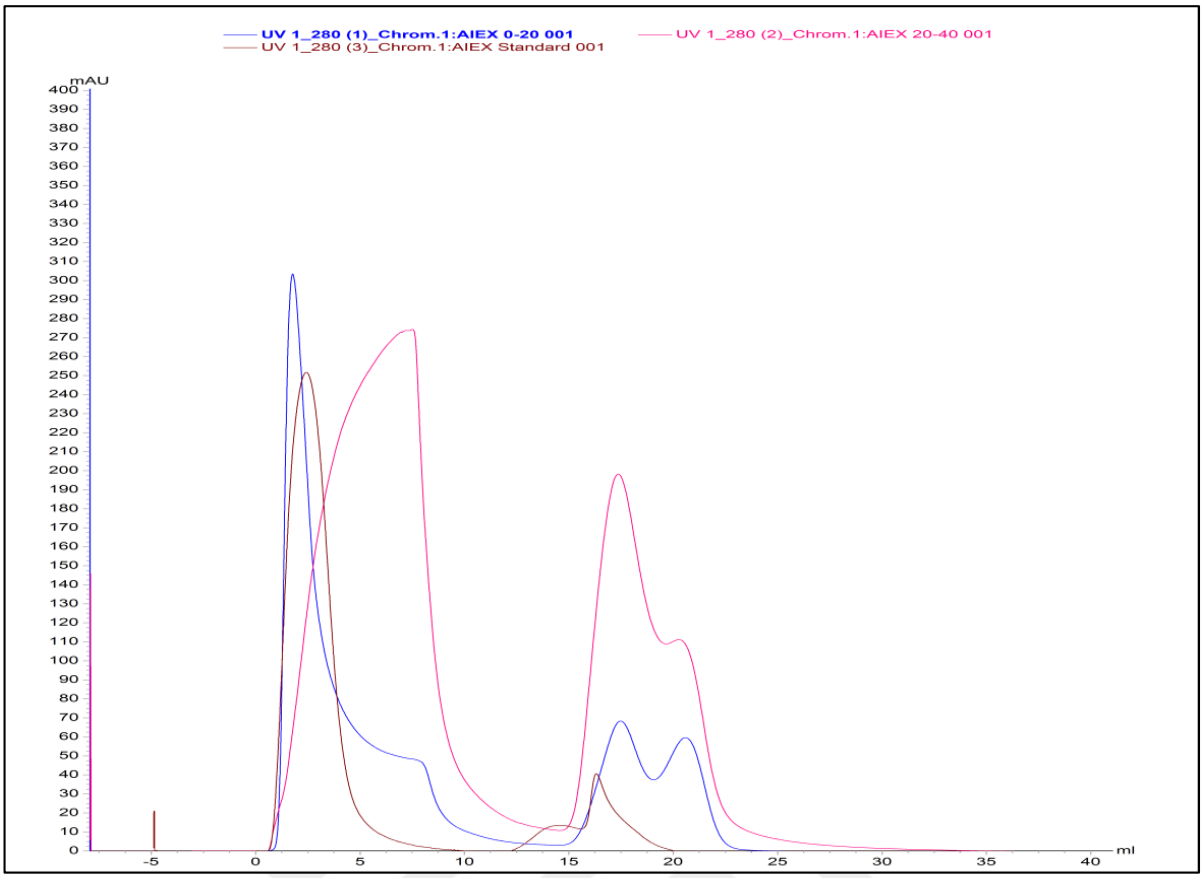
Aralık	Süpernatant Miktarı (mL)	Amonyum Sülfat Miktarı (Gr)
0-20	300 ml	31,80 gr
20-40	312 ml	35,17 gr
40-60	318 ml	38,28 gr
60-80	330 ml	42,63 gr

Kitinaz enzimi için her bir amonyum sülfat doygunluk aralığında çökeltinin enzim aktivitesi ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 11'de verilmiştir. Elde edilen çökeltilerden en yüksek aktivitenin görüldüğü 0-20 ve 20-40 aralıkları Akta avant'a yüklenerek enzimin tam olarak saflaştırılması sağlanmıştır.

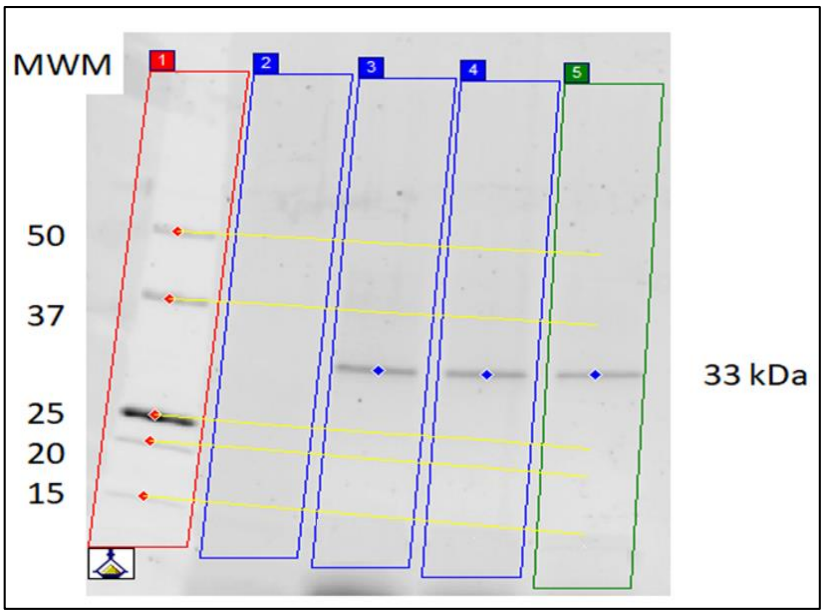


Şekil 11. Amonyum sülfat çöktürme aralıklarının kitinaz enzimi aktivitesi

Uyguladığımız yeni metoda göre kitinaz enziminin cihazda saflaştırma zamanının bilinmesi için internal standart, cihaza numune gibi okutulmuştur. Daha sonra 0-20, 20-40 aralıkları okutularak pikler elde edilmiştir. Kitinaz enziminin doğruluğunu kontrol etmek için cihazdan gelen yanıtlar üst üste çakıştırılmış ve elde edilen grafik Şekil 12' de verilmiştir. Saflaştırılan enzime SDS-PAGE analizi yapılmış ve moreküler kütlesi ~ 33 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 13).



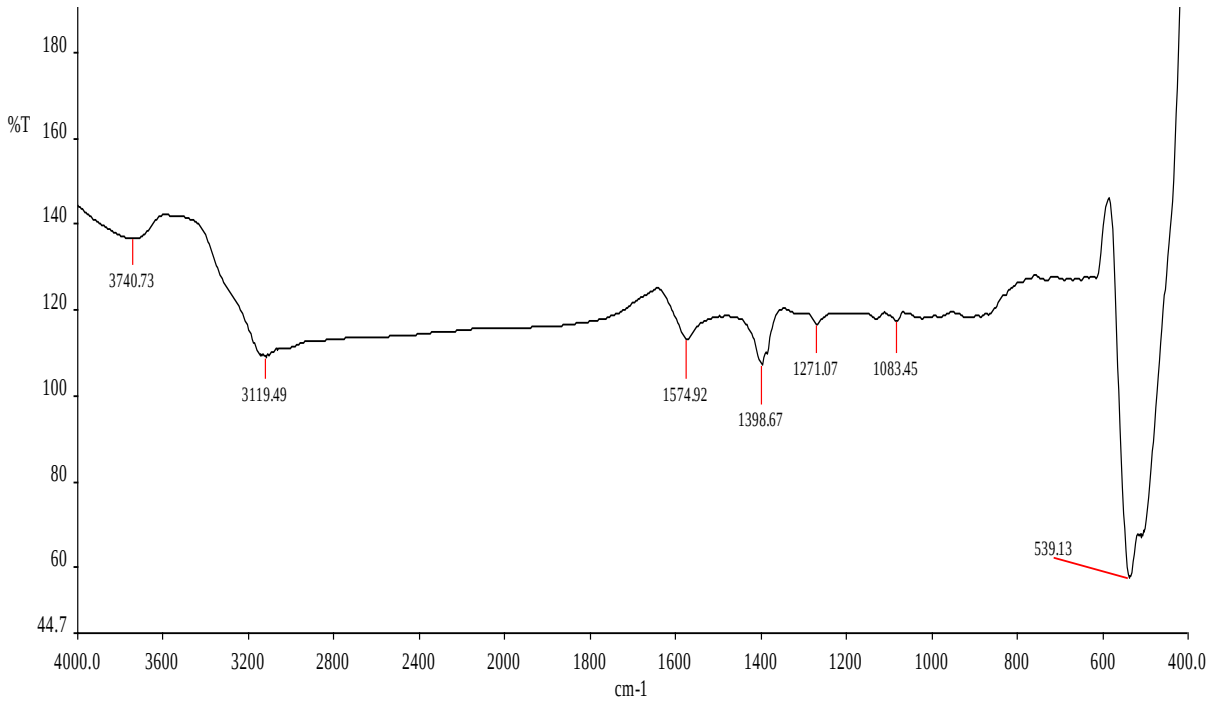
Şekil 12. AKTA Avant cihazında tüm aralıkların ve standardın çakıştırılmış grafik görüntüsü



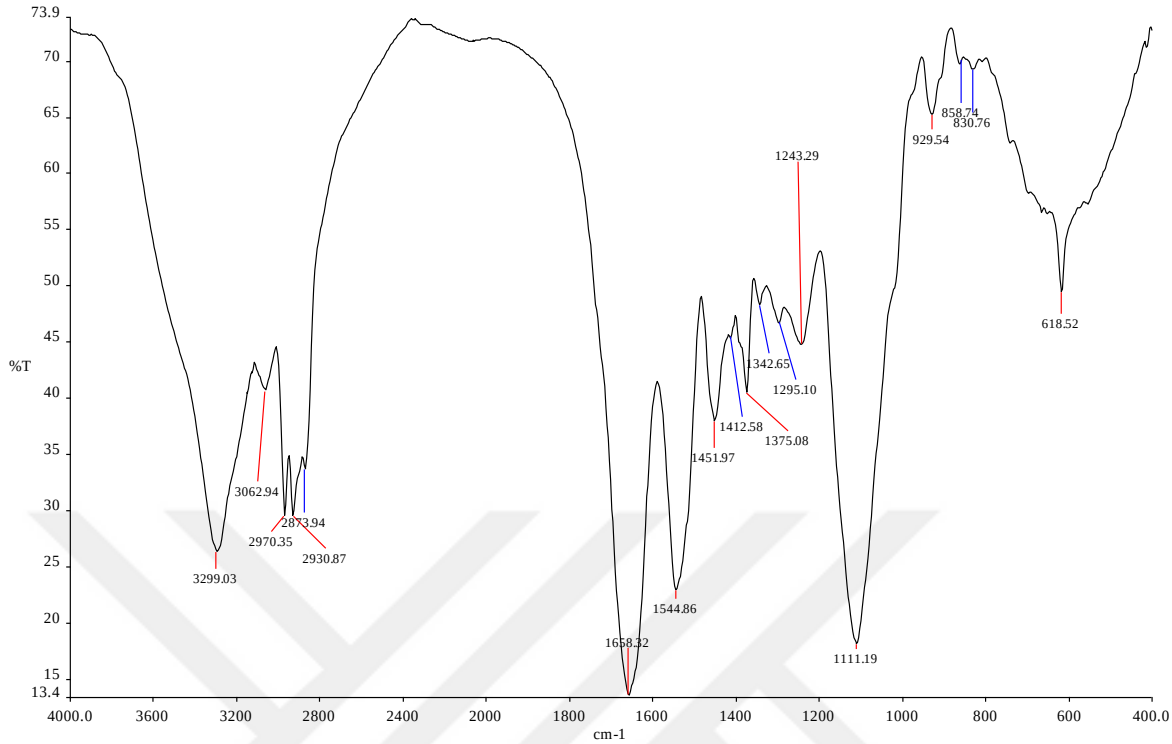
Şekil 13. *L. coryniformis*'ten saflaştırılan kitinaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü

FTIR Analizi

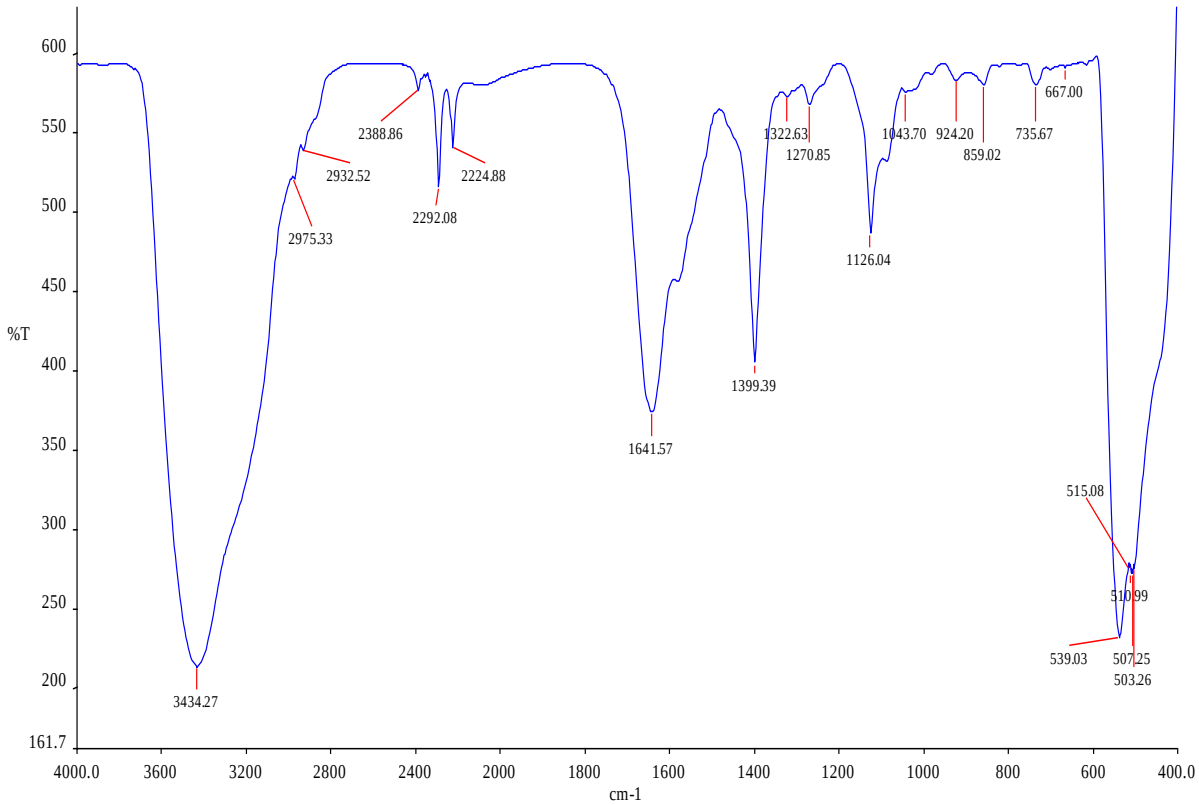
Kitinaz enzimi ile immobilize edilen ZnO nanoparçacıklarının kimyasal bileşimi FTIR spektroskopisi ile Şekil 16'da verilen spektrumdan yararlanılarak aydınlatılmıştır. Karşılaştırma yapmak amacıyla sadece ZnO nanopartikülleri ve yine sadece kitinaz enzimine ait FTIR spektrumları da sırasıyla Şekil 14 ve Şekil 15'te verilmiştir. Kitinaz enzimi ile ZnO nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde immobilize edilmesi FTIR spektrumundan faydalanılarak gösterilmiştir. Şekil 16'da kitinaz enzimi ile inmobilize edilen ZnO'e ait FTIR spektrumu peptit bağının C=O gerilme titreşimlerinden kaynaklanan 1641 cm^{-1}'de amid I bağlantısına, N–H bükülme titreşimi/C–N gerilme titerşiminin bir sonucu olarak sırasıyla 1575 ve 1301 cm^{-1}'de amid II ve amid III bağlantılarına ve düzlem dışı N–H bükülme titreşimi içinde 800 cm^{-1}'de amid V bağlantısına karşılık gelen piklerin ortaya çıkmasıyla enzimin varlığını doğrulamaktadır. Ayrıca, aynı spektrumdaki 2932 ve 2975 cm^{-1}'deki bantlar enzimdeki –CH ve CH2 gruplarının gerilme titreşimlerine atfedilebilir. İlaveten dalga sayısı yaklaşık 500 cm^{-1}'in üstündeki bölgede yer alan güçlü absorpsiyon bandı Zn–O bağ titreşiminin bir sonucudur. Kitinaz enzimi ile immobilize edilen ZnO nanpartikülleri için elde edilen FTIR spektrumları sadece ZnO ve kitinaz enzimine ait spektrumlarla karşılaştırıldığı zaman, ZnO ve enzim arasındaki adsorpsiyondan dolayı pik değerlerinin daha düşük dalga boylu bölgeye kayması ve piklerin şiddetlerinin azalması dışında herbir bileşenin kendi karakteristik yapısını koruduğu açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 14. ZnO nanopartikülünün FTIR görüntüsü



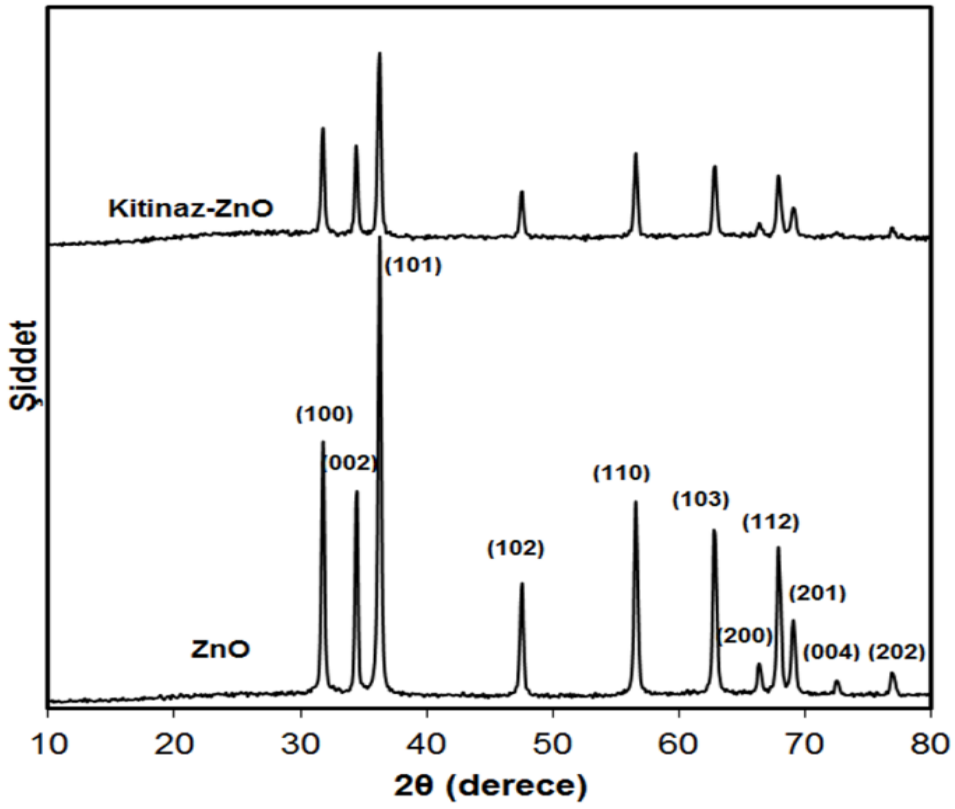
Şekil 15. Kitinaz Enziminin FTIR görüntüsü



Şekil 16. Kitinaz immobilize ZnO nanopartikülünün FTIR görüntüsü

XRD Analizi

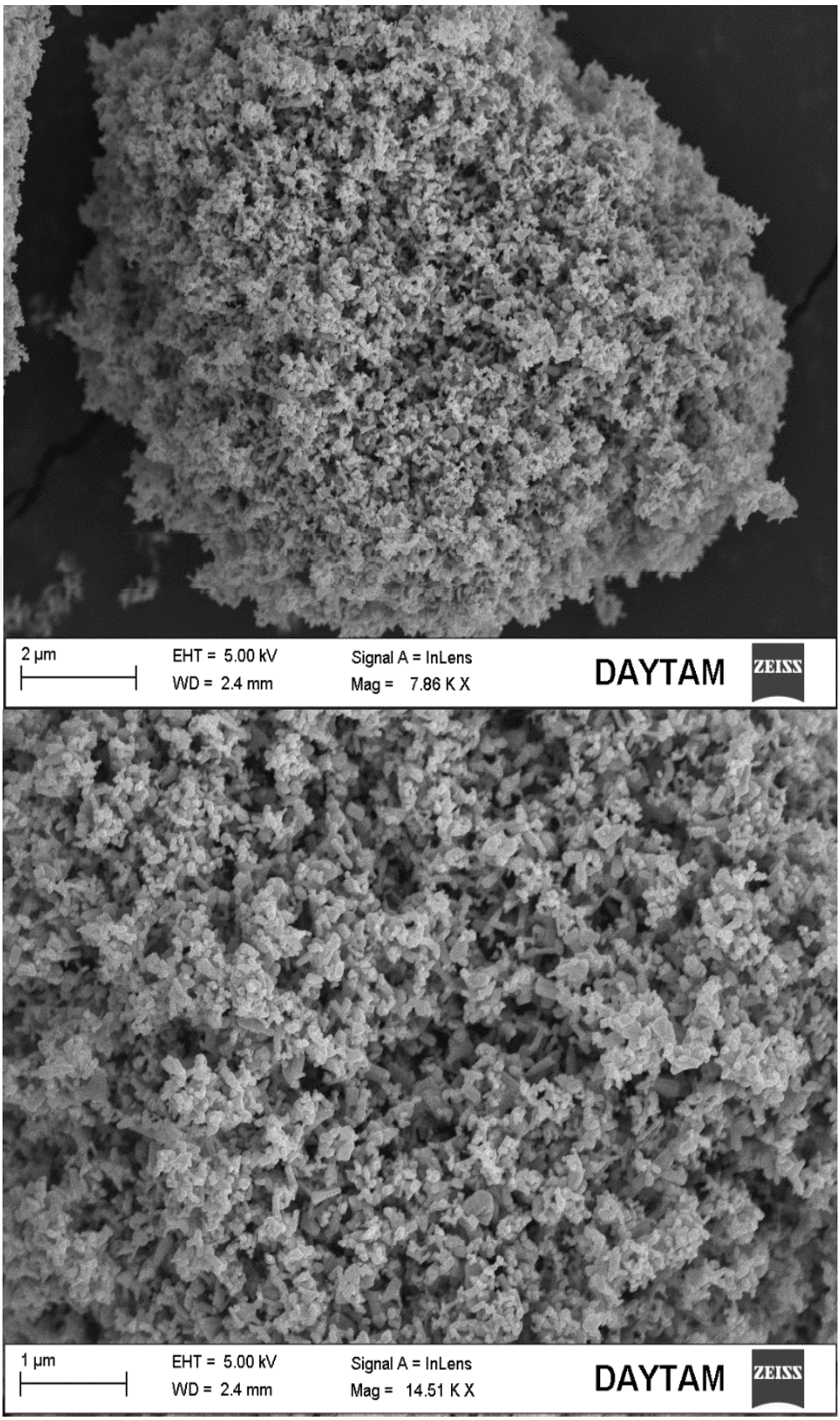
Kitinaz immobilize ZnO parçacıklarının kristal yapısını incelemek için X-ışınları kırınım (XRD) ölçümleri alınmış ve Şekil 17'de gösterildiği gibi yüksek saflıktaki ZnO parçacıkları ile karşılaştırılmıştır. Her iki spektrumunda yüksek kırınım şiddetine sahip olması hem ticari olarak bu proje kapsamında satın alınan ZnO nanoparçacıklarının ve hemde kitinaz enzimi ile inmobilize edilen ZnO'in yüksek oranda kristalize olduğunun bir göstergesidir. Her iki spektrum üzerinde de bulunan kırınım piklerinin tamamı hekzagonal wurtzite çinko oksit nano yapısına aittir. Şekil 17'deki bu XRD difraktogramlarında 2θ ölçeğinde 31,7°, 34,4°, 36,5°, 47,7°, 56,6°, 62,8°, 66,5°, 67,9°, 69,4° ve 72,7°'de yüksek şiddetlerde gözlenen difraksiyon pikleri sırasıyla çinko oksitin (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) ve (202) düzlemlerdeki yansımalarına karşılık gelmektedir. Aynı zamanda, kitinaz enzimi ile immobilize edilen ZnO'e ait kırınım piklerinin çok sayıda ve şiddetli olması da sentezlenen ürünlerin yüksek kristal özellikte olduğunun ve herhangi bir safsızlık pikine rastlanmaması da ZnO'in kristal yapısının bozulmadığını ifade etmektedir. Ancak, immobilize edilen ZnO'e ait spektrumda çinko oksite ait kırınım piklerinin daha düşük şiddette olması her iki spektrum arasındaki tek farktır.



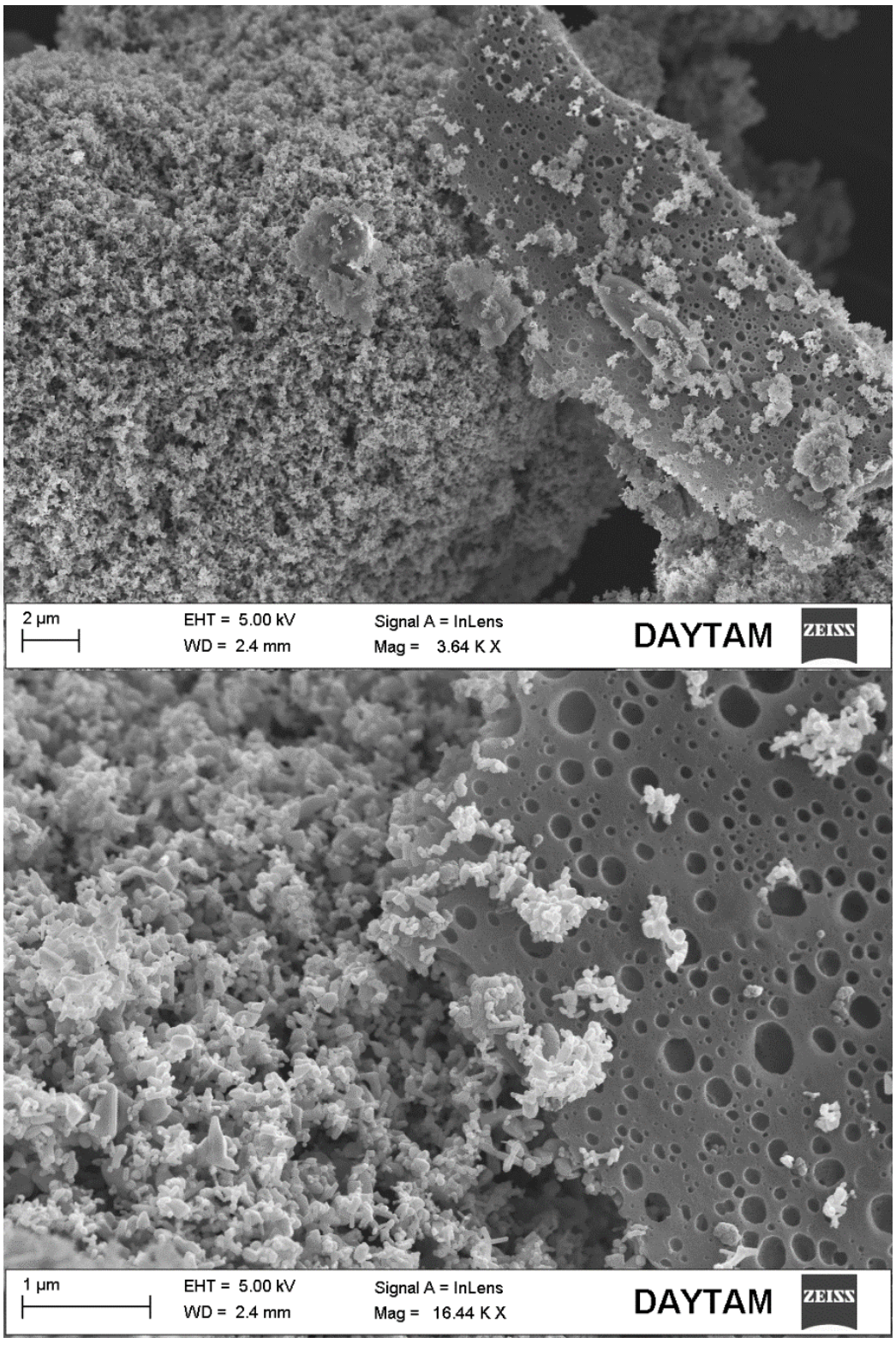
Şekil 17. Saf ZnO ve kitinaz immobilize ZnO parçaıklarının XRD spektrumları

SEM Analizi

Saf ZnO (Şekil 18) ve kitinaz immobilize ZnO (Şekil 19) nanopartiküllerinin morfolojik yapısı farklı büyütmelerde SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Bu görüntülerden biyokompozitin, ortalama 18 μm boyutlarına sahip küresel ZnO parçacıklarının yüzeyine yaklaşık 8 μm genişliğindeki kitinaz enziminin tutunduğu açık bir şekilde görülmektedir (Şekil 19). Kısacası, biyokompozitin her iki bileşeninde kendilerine has morfolojik özelliklerini koruduğu bir yapı göze çarpmaktadır. Özellikle enzim ile immobilizasyondan sonrada küresel ZnO parçacıklarının yapısının korunduğu ve bu parçacığa adsorplanan enzimi içeren bir kombinasyonun oluştuğu belirgin bir şekilde fark edilmektedir. Yüksek büyütmeli olarak (43000x), hazırlanan biyokompozitlere daha yakından bakıldığında ise ilginç bir şekilde her bir mikro ZnO küresinin genişlikleri 10 ile 80 nm aralığında değişen nanoparçacıklardan oluştuğu gözlenmektedir. Aynı zamanda yüksek çözünürlüklü SEM görüntüleri, bu nanoparçacıkların, gözenekli bir yapıdaki enzimin düz yüzeyini de kapladığını çok net bir şekilde göstermektedir. Enzim ve çinko oksit nanopartikülünün immobilizasyonunun aşağıda verilen görüntülerle yüksek adsorpsiyon sağladığı doğrulanmıştır. Formülasyonun efektifliğinin arttırılması açısından enzimlerin immobilizasyonu oldukça önemlidir.



Şekil 18. ZnO nanopartikülünün SEM görüntüsü

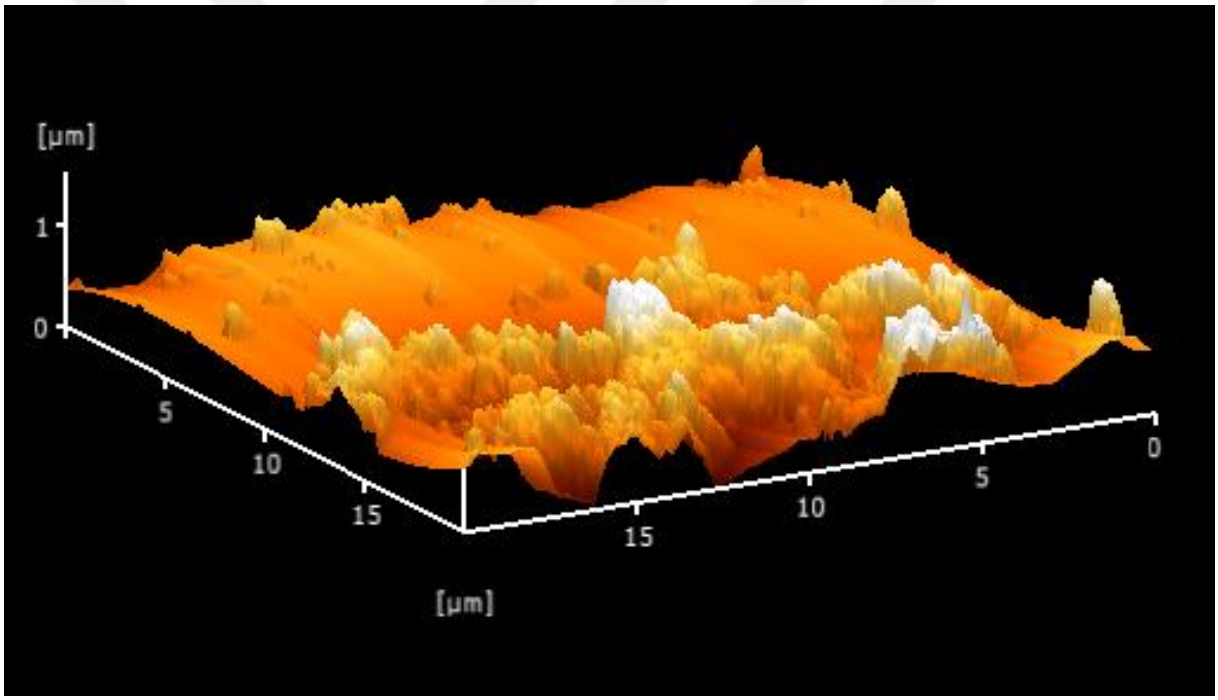


Şekil 19. Kitinaz immobilize ZnO nanopartikülünün SEM görüntüsü

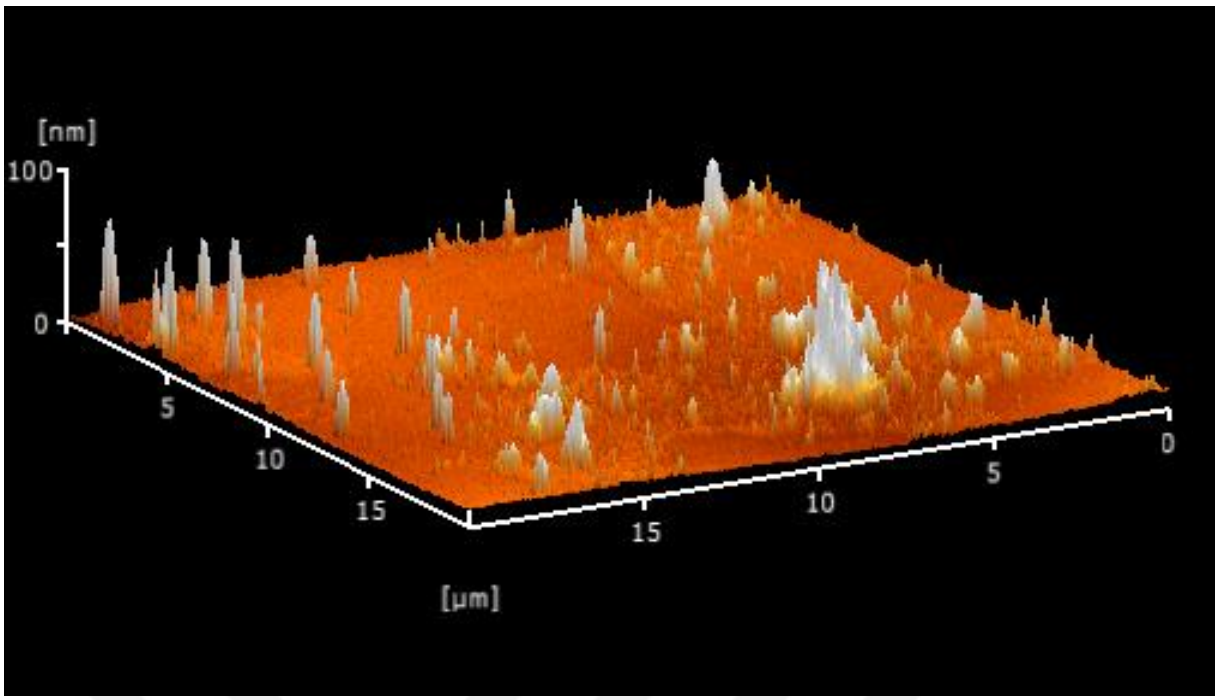
AFM Analizi

SEM'in yanısıra "AFM" enzimle modifikasyondan önce ve sonra ZnO parçacıklarının topolojik görünümünü belirlemek için kullanılmış ve nanoölçekteki yüzeyin 3 boyutlu profilinden yararlanılarak ortalama parçacık boyutunun yaklaşık 60 nm olduğu tespit edilmiştir. Yani, bu görüntüler referans alınarak her bir mikrometre boyutundaki küresel ZnO

parçacığının nanometre büyüklüğündeki taneciklerden oluştuğu söylenebilir. AFM görüntüleri aynı zamanda kitinaz ile immobilizasyondan önce (Şekil 20) (Ra:129 nm) ve sonraki (Şekil 21) (Ra:7,1 nm) pürüzlülük derecesinin belirlenmesi içinde kullanılmıştır. AFM ile incelenen yüzey topolojileri, enzim ile modifikasyondan sonra ZnO parçacıklarından oluşan tabaka yapısının belirgin bir değişikliğe uğradığını desteklemektedir. Çıplak ZnO parçacıklarından oluşan tabakanın yüksek orandaki pürüzlü yüzeyinin enzim ilavesi ile daha düzenli bir tabaka yapısı oluşturduğu açık bir şekilde görülmektedir. Bunun sebebi olarak kitinaz enzimi ile modifikasyondan sonra ZnO nanoparçacıklarının topaklanma derecesinin azalması gösterilebilir. Sonuç olarak, tarafımızdan hazırlanan enzim temelli bu biyokompozitler için elde edilen FTIR, XRD, AFM ve SEM gibi yapısal ve morfolojik analizler kitinaz enzimin başarılı bir şekilde ZnO yüzeyine tutturulduğunu güçlü bir şekilde ispatlamaktadır.



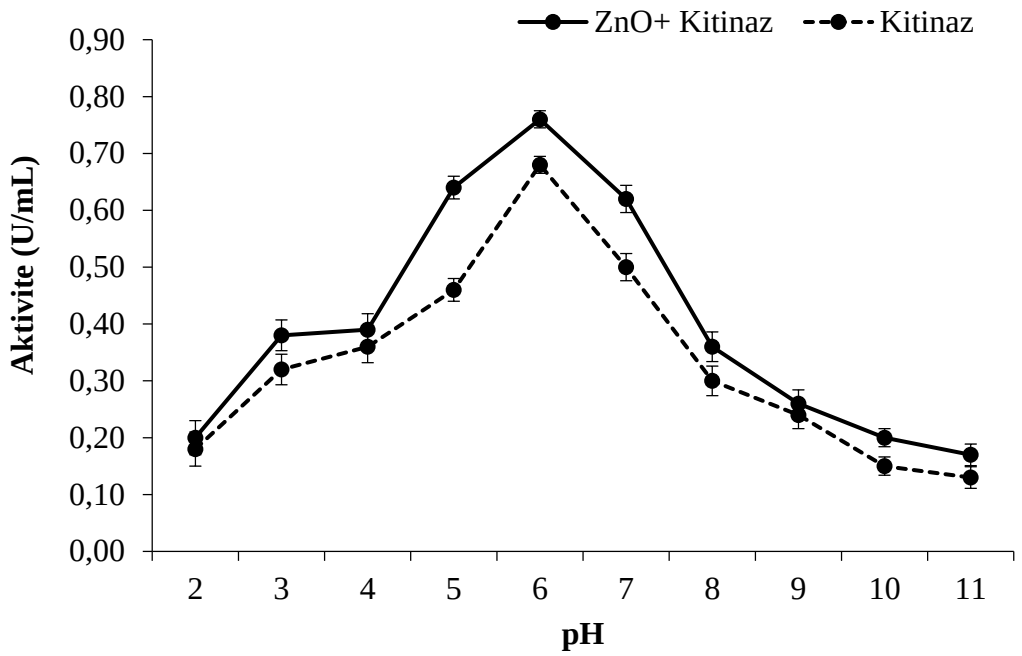
Şekil 20. ZnO nanopartikülünün AFM görüntüsü



Şekil 21. Kitinaz immobilize ZnO nanopartikülünün AFM görüntüsü

İmmobilize ve Serbest Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

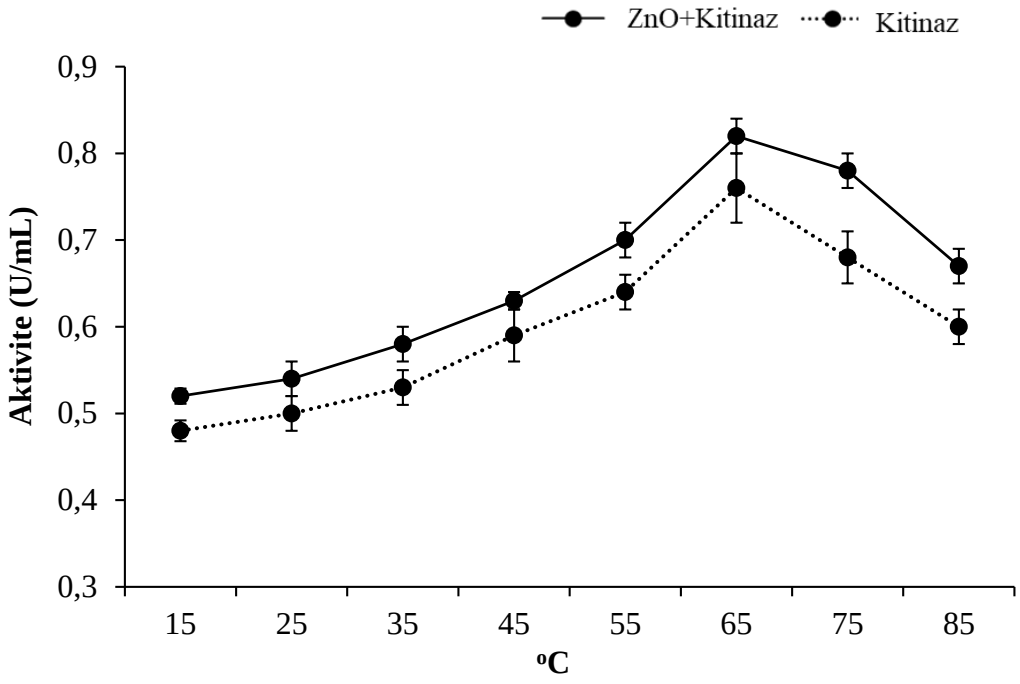
Farklı pH değerlerinde enzim aktiviseti ölçülerek immobilize ve serbest kitinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, en yüksek aktivitenin gözlendiğioptimum pH değerinin 6,0 olduğu belirlenmiş ve aktivite sonuçları Şekil 22'de verilmiştir.



Şekil 22. İmmobilize ve sebest kitinaz enzimine pH'nın etkisi

İmmobilize ve Serbest Kitinaz Enzimine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

İmmobilize ve serbest kitinaz enziminin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için farklı sıcaklıklarda (15; 25; 35; 45; 55; 65; 75; 85 ºC) enzim aktivitesi ölçülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda, en yüksek aktivitenin gözlendiği sıcaklığın 65-75 ºC aralığında olduğu belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 23'te verilmiştir.



Şekil 23. İmmobilize ve serbest kitinaz enzimine sıcaklığın etkisi

Nano Formülasyon Dozlarının Uygulanması

Çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerine kitinazın immobilizasyonu yapılarak 5 farklı nano-formülasyon dozu (Enzim+ZnO 2 mg/L, Enzim+ZnO 4 mg/L, Enzim+ZnO 6 mg/L, Enzim+ZnO 8 mg/L, Enzim+ZnO 10 mg/L) ile 5 kontrol olmak üzere on farklı uygulama yapılmış ve her uygulamada 25 böcek kullanılmıştır. Yirmi sekiz gün boyunca aynı saatte sayımlar yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 2' de verilmiştir. Günlük sayımlar sonucunda elde edilen veriler kullanılarak yedi günlük periyotlarla toplam böcek ölümleri hesaplanmış ve Şekil 24' te verilmiştir.

Tablo 2. Uygulamaların Tekerrürlerine Göre Günlük Ölü (Ö) ve Canlı (C) Böcek Sayısı

UYGULAMA		1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7
	T	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C
Enzim+ZnO 2 mg/L	1	23	2	23	2	24	1	24	1	24	1	24	1	25	0
	2	17	8	17	8	17	8	20	5	21	4	21	4	21	4
	3	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	15	10
Ortalama		17,6± 2,91	7,3±2,91	17,6±2,91	7,3±2,91	18±3,21	7±3,21	19±3,21	6±3,21	19,3±3,28	5,7±3,28	19,3±3,28	5,7±3,28	20,3±2,91	4,7±2,91
Enzim+ZnO 4 mg/L	1	19	6	22	3	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	9	16	9	16	12	13	16	9	16	9	18	7	19	6
	3	4	21	4	21	9	15	9	15	11	14	14	11	18	7
Ortalama		10,7±4,41	14,3±4,41	11,7±5,36	13,3±5,36	15,3±4,91	9,3±4,70	16,7±4,63	8±4,36	17,3±4,10	7,7±4,10	19±3,21	6±3,21	20,7±2,19	4,3±2,19
Enzim+ZnO 6 mg/L	1	17	8	19	6	21	4	21	4	21	4	21	4	21	4
	2	20	5	20	5	22	3	22	3	22	3	22	3	24	1
	3	20	5	22	3	22	3	22	3	22	3	24	1	24	1
Ortalama		19±1	6±1	20,3±0,88	4,7±0,88	21,7±0,33	3,3±0,33	21,7±0,33	3,3±0,33	21,7±0,33	3,3±0,33	22,3±0,88	2,7±0,88	23±1	2±1
Enzim+ZnO 8 mg/L	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	18	7	18	7	18	7	18	7	18	7	19	6	19	6
	3	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Ortalama		22,7±2,33	2,3±2,33	22,7±2,33	2,3±2,33	22,7±2,33	2,3±2,33	22,7±2,33	2,3±2,33	22,7±2,33	2,3±2,33	23±2,00	2±2,00	23±2,00	2±2,00
Enzim+ZnO 10 mg/L	1	5	20	5	20	6	19	6	19	17	8	19	6	19	6
	2	8	17	8	17	10	15	14	11	19	6	19	6	19	6
	3	12	13	18	7	18	7	18	7	20	5	22	3	22	3
Ortalama		8,3±2,03	16,7±2,03	10,3±3,93	14,7±3,93	11,3±3,53	13,7±3,53	12,7±3,53	12,3±3,53	18,7±0,88	6,3±0,88	20±1	5±1	20±1	5±1
Enzim	1	1	24	1	24	1	24	2	23	14	11	14	11	15	10
	2	0	25	0	25	1	24	2	23	13	12	13	12	13	12
	3	2	23	2	23	2	23	6	19	6	19	6	9	10	15
Ortalama		1±0,58	24±0,58	1±0,58	24±0,58	1,3±0,33	23,7±0,33	3,3±1,33	21,7±1,33	11±2,52	14±2,52	11±2,52	10,7±0,88	12,7±1,45	12,3±1,45
Bakteri	1	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	5	20
	2	0	25	0	25	0	25	2	23	3	22	3	22	5	20
	3	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
Ortalama		0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0,7±0,67	24,3±0,67	1±1	24±1	1±1	24±1	3,3±1,67	21,7±1,67
Su	1	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
	2	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
	3	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
Ortalama		0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0
ZnO	1	4	21	4	21	8	17	18	7	18	7	19	6	19	6
	2	10	15	10	15	13	12	16	9	17	8	17	8	17	8
	3	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13
Ortalama		8,7±2,40	16,3±2,40	8,7±2,40	16,3±2,40	11±1,53	14±1,53	15,3±1,76	9,7±1,76	15,7±1,86	9,3±1,86	16±2,08	9±2,08	16±2,08	9±2,08
Malationin	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	3	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Ortalama		25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0

Tablo 2. devam

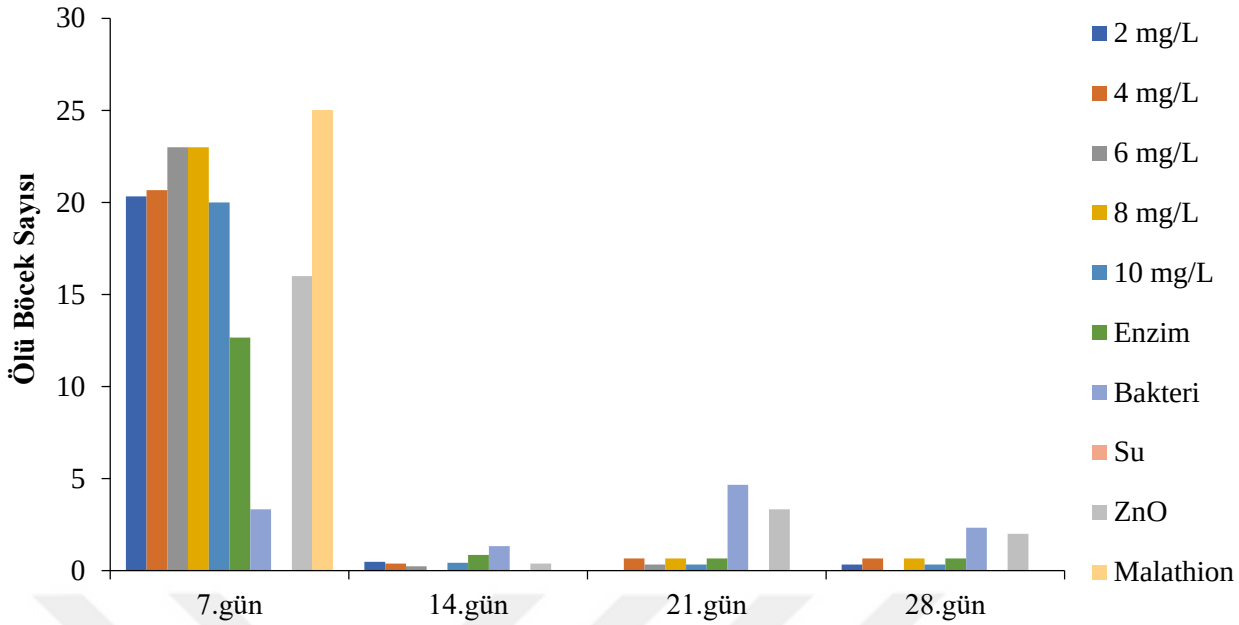
UYGULAMA	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12	13	13	14	14
	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C
Enzim+ZnO 2 mg/L	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	21	4	23	2	23	2	24	1	24	1	24	1	25	0
	15	10	18	7	20	5	21	4	21	4	21	4	21	4
Ortalama	20,3±2,91	4,7±2,91	22±2,08	3±2,08	22±1,45	3±1,45	23,3±1,20	2,7±1,20	23,3±1,20	2,7±1,20	23,3±1,20	2,7±1,20	23,7±1,33	1,3±1,33
Enzim+ZnO 4 mg/L	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	20	5	21	4	21	4	22	3	22	3	22	3	22	3
	18	7	18	7	21	4	21	4	23	2	23	2	23	2
Ortalama	21±2,08	4±2,08	21,3±2,03	3,7±2,03	22,3±1,33	2,7±1,33	22,7±1,20	2,3±1,20	23,3±0,88	1,7±0,88	23,3±0,88	1,7±0,88	23,3±0,88	1,7±0,88
Enzim+ZnO 6 mg/L	21	4	21	4	21	4	22	3	22	3	23	2	24	1
	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1	25	0
Ortalama	23,3±1,20	1,7±1,20	23,3±1,20	1,7±1,20	23,3±1,20	1,7±1,20	23,7±0,88	1,3±0,88	23,7±0,88	1,3±0,88	24±0,88	1±0,58	24,7±0,58	0,3±0,33
Enzim+ZnO 8 mg/L	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	19	6	19	6	19	6	19	6	19	6	19	6	19	6
	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Ortalama	23±2,00	2±2,00	23±2,00	2±2,00	23±2,00	2±2,00	23±2,00	2±2,00	23±2,00	2±2,00	23±2,00	2±2,00	23±2,00	2±2,00
Enzim+ZnO 10 mg/L	21	4	21	4	23	2	23	2	23	2	24	1	24	1
	19	6	21	4	21	4	21	4	21	4	22	3	22	3
	22	3	22	3	22	3	23	2	23	2	23	2	23	2
Ortalama	20,7±0,88	4,3±0,88	21,3±0,33	3,7±0,33	22±0,58	3±0,58	22,3±0,67	2,7±0,67	22,3±0,67	2,7±0,67	23±0,58	2±0,58	23±0,58	2±0,58
Enzim	15	10	17	8	17	8	19	6	19	6	19	6	19	6
	15	10	15	10	16	9	16	9	16	9	16	9	18	7
	14	11	17	8	17	8	19	6	19	6	19	6	19	6
Ortalama	14,7±0,33	10,3±0,33	16,3±0,67	8,7±0,67	16,7±0,33	8,3±0,33	18±1	7±1	18±1	7±1	18±1	7±1	18,7±0,33	6,3±0,33
Bakteri	8	17	12	13	12	13	14	11	14	11	14	11	15	10
	9	16	9	16	10	15	12	13	12	13	15	10	15	10
	2	23	4	21	4	21	5	20	6	19	6	19	8	17
Ortalama	6,3±2,19	18,7±2,19	8,3±2,33	16,7±2,33	8,7±2,40	16,3±2,40	10,3±2,73	14,7±2,73	10,7±2,40	14,3±2,40	11,7±2,85	13,3±2,85	12,7±2,33	12,3±2,33
Su	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
Ortalama	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0
ZnO	19	6	21	4	22	3	22	3	22	3	22	3	24	1
	17	8	17	8	17	8	17	8	17	8	17	8	17	8
	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	15	10
Ortalama	16±2,08	9±2,08	16,7±2,60	8,3±2,60	17±2,89	8±2,89	17±2,89	8±2,89	17±2,89	8±2,89	17±2,89	8±2,89	18,7±2,73	6,3±2,73
Malationin	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Ortalama	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0

Tablo 2. (devamı)

UYGULAMA		15	15	16	16	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21
	T	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C
Enzim+ZnO 2 mg/L	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	3	21	4	21	4	21	4	21	4	21	4	21	4	21	4
Ortalama		23,7±1,33	1,3±1,33	23,7±1,33	1,3±1,33	23,7±1,33	1,3±1,33	23,7±1,33	1,3±1,33	23,7±1,33	1,3±1,33	23,7±1,33	1,3±1,33	23,7±1,33	1,3±1,33
Enzim+ZnO 4 mg/L	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	22	3	22	3	22	3	22	3	22	3	22	3	22	3
	3	23	2	23	2	23	2	23	2	25	0	25	0	25	0
Ortalama		23,3±0,88	1,7±0,88	23,3±0,88	1,7±0,88	23,3±0,88	1,7±0,88	23,3±0,88	1,7±0,88	24±1	1±1	24±1	1±1	24±1	1±1
Enzim+ZnO 6 mg/L	1	24	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	3	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Ortalama		24,7±0,33	0,3±0,33	25±0,33	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0
Enzim+ZnO 8 mg/L	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	19	6	19	6	19	6	19	6	21	4	21	4	21	4
	3	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Ortalama		23±2,00	2±2,00	23±2,00	2±2,00	23±2,00	2±2,00	23±2,00	2±2,00	23,7±1,33	1,3±1,33	23,7±1,33	1,3±1,33	23,7±1,33	1,3±1,33
Enzim+ZnO 10 mg/L	1	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1
	2	22	3	22	3	22	3	22	3	22	3	23	2	23	2
	3	23	2	23	2	23	2	23	2	23	2	23	2	23	2
Ortalama		23±0,58	2±0,58	23±0,58	2±0,58	23±0,58	2±0,58	23±0,58	2±0,58	23±0,58	2±0,58	23,3±0,33	1,7±0,33	23,3±0,33	1,7±0,33
Enzim	1	21	4	21	4	21	4	21	4	21	4	21	4	21	4
	2	18	7	18	7	18	7	18	7	18	7	18	7	18	7
	3	19	6	19	6	19	6	19	6	19	6	19	6	19	6
Ortalama		19,3±0,88	5,7±0,88	19,3±0,88	5,7±0,88	19,3±0,88	5,7±0,88	19,3±0,88	5,7±0,88	19,3±0,88	5,7±0,88	19,3±0,88	5,7±0,88	19,3±0,88	5,7±0,88
Bakteri	1	15	10	15	10	16	9	16	9	16	9	17	8	17	8
	2	18	7	19	6	19	6	20	5	20	5	20	5	20	5
	3	10	15	10	15	11	14	12	13	12	13	15	10	15	10
Ortalama		14,3±2,33	10,7±2,33	14,7±2,60	10,3±2,60	15,3±2,33	9,7±2,33	16±2,31	9±2,31	16±2,31	9±2,31	17,3±1,45	7,7±1,45	17,3±1,45	7,7±1,45
Su	1	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
	2	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
	3	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
Ortalama		0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0
ZnO	1	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1
	2	17	8	17	8	19	6	19	6	19	6	21	4	21	4
	3	15	10	15	10	17	8	17	8	19	6	19	6	21	4
Ortalama		18,7±2,73	6,3±2,73	18,7±2,73	6,3±2,73	20±2,08	5±2,08	20±2,08	5±2,08	20,7±1,67	4,3±1,67	21,3±1,45	3,7±1,45	22±1	3±1
Malationin	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	3	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Ortalama		25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0

Tablo 2. (devamı)

UYGULAMA		22	22	23	23	24	24	25	25	26	26	27	27	28	28
	T	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C
Enzim+ZnO 2 mg/L	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	3	21	4	22	3	22	3	22	3	22	3	22	3	22	3
Ortalama		23,7±1,33	1,3±1,33	24±1	1±1	24±1	1±1	24±1	1±1	24±1	1±1	24±1	1±1	24±1	1±1
Enzim+ZnO 4 mg/L	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	22	3	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1
	3	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Ortalama		24±1	1±1	24,7±0,33	0,3±0,33	24,7±0,33	0,3±0,33	24,7±0,33	0,3±0,33	24,7±0,33	0,3±0,33	24,7±0,33	0,3±0,33	24,7±0,33	0,3±0,33
Enzim+ZnO 6 mg/L	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	3	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Ortalama		25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0
Enzim+ZnO 8 mg/L	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	22	3	22	3	22	3	22	3	23	2	23	2	23	2
	3	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Ortalama		24±1	1±1	24±1	1±1	24±1	1±1	24±1	1±1	24,3±0,67	0,7±0,67	24,3±0,67	0,7±0,67	24,3±0,67	0,7±0,67
Enzim+ZnO 10 mg/L	1	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1	24	1
	2	23	2	23	2	23	2	23	2	23	2	24	1	24	1
	3	23	2	23	2	23	2	23	2	23	2	23	2	23	2
Ortalama		23,3±0,33	1,7±0,33	23,3±0,33	1,7±0,33	23,3±0,33	1,7±0,33	23,3±0,33	1,7±0,33	23,3±0,33	1,7±0,33	23,7±0,33	1,3±0,33	23,7±0,33	1,3±0,33
Enzim	1	21	4	22	3	22	3	22	3	22	3	22	3	22	3
	2	18	7	18	7	18	7	18	7	18	7	18	7	18	7
	3	19	6	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5
Ortalama		19,3±0,88	5,7±0,88	20±1,15	5±1,15	20±1,15	5±1,15	20±1,15	5±1,15	20±1,15	5±1,15	20±1,15	5±1,15	20±1,15	5±1,15
Bakteri	1	17	8	18	7	18	7	18	7	18	7	18	7	18	7
	2	20	5	20	5	20	5	20	5	20	6	20	5	20	5
	3	15	10	17	8	17	8	19	6	19	6	20	5	21	4
Ortalama		17,3±1,45	7,7±1,45	18,3±0,88	6,7±0,88	18,3±0,88	6,7±0,88	19±0,58	6±0,58	19±0,33	6,3±0,33	19,3±0,67	5,7±0,67	19,7±0,88	5,3±0,88
Su	1	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
	2	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
	3	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
Ortalama		0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0
ZnO	1	24	1	24	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	22	3	22	3	22	3	22	3	24	1	24	1	24	1
	3	21	4	21	4	22	3	22	3	23	2	23	2	23	2
Ortalama		22,3±0,88	2,7±0,88	22,3±0,88	2,7±0,88	23±1	2±1	23±1	2±1	24±0,58	1±0,58	24±0,58	1±0,58	24±0,58	1±0,58
Malationin	1	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	2	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
	3	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
Ortalama		25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0	25±0	0±0



Şekil 24. Yedi günlük periyotlarla toplam böcek ölümlerini gösteren grafik

Uygulamaların *S. zeamais*'ın ölüm oranına ve ortalama ölüm zamanına olan etkisi tek yönlü varyans (ANOVA) analiziyle belirlenmiş, ortalamalar arasındaki farklar %5 ihtimal seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testiyle belirlenmiştir. Ölüm oranı ve ortalama ölüm zamanı aşağıdaki formüllerle belirlenmiştir:

$Ölüm\ oranı\ (\%) = \frac{n}{N} x100$, n deneme sonunda ölen böceklerin sayısı, N toplam böcek sayısı

$Ortalama\ ölüm\ zamanı\ (gün) = \frac{\sum n_i t_i}{\sum n_i}$ n_i: t_i günündeki ölüm sayısı, t_i: sayım günü

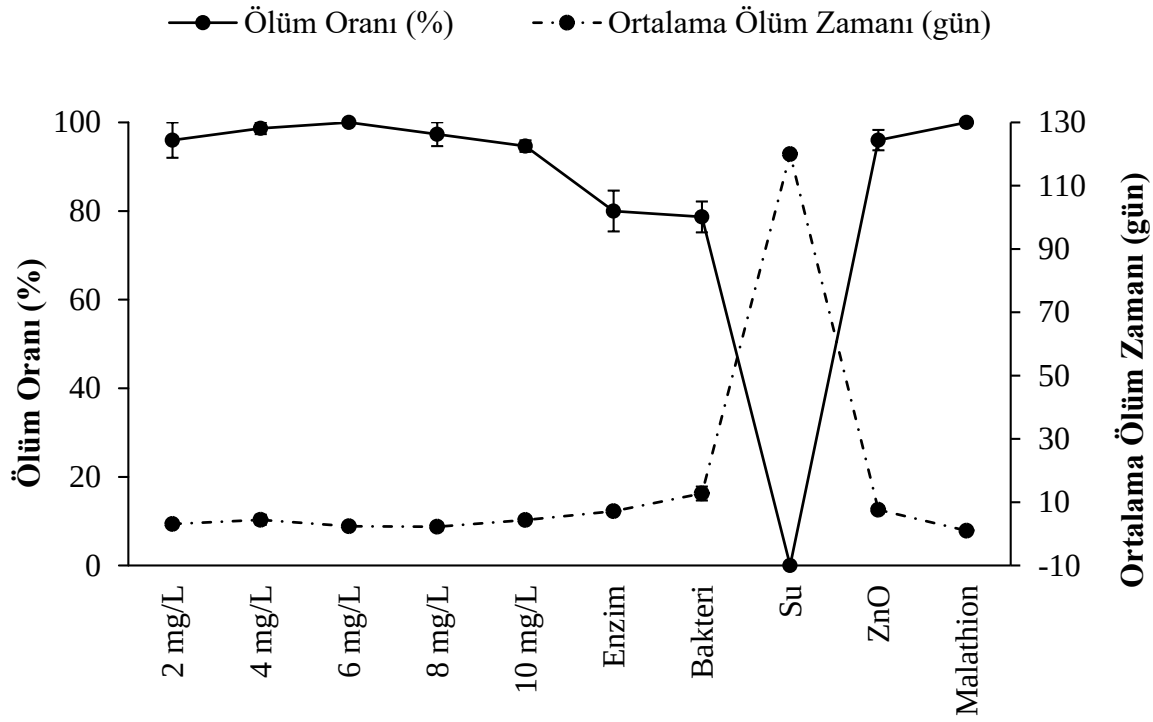
Yapılan analiz sonucunda uygulamaların ölüm oranına etkisinin çok önemli olduğu ($p<0,01$) ve uygulamalara göre ölüm oranlarının %0.000 ile %100 arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 3). Ortalama ölüm zamanı ve ortalama ölüm oranı arasında anlamlı bir ilişki olduğu ve ölüm oranı arttıkça ortalama ölüm zamanının azaldığı Şekil 25' te görülmüştür. En yüksek ölüm oranı 6 mg/L ve Malathion uygulamalarında meydana gelirken bunu azalan sıra ile 4 mg/L, 8 mg/L ve ZnO nanopartikülü uygulamaları takip etmiş ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir. Bu uygulamalarla diğer uygulamalar (2mg/L, 10mg/L, bakteri, enzim, su) arasındaki fark önemli bulunmuştur. Diğer taraftan uygulamaların zararlının ortalama ölüm zamanına olan etkisi çok önemli olmuş ($p<0,01$) ve uygulamalara göre ölüm zamanı 120-1 gün arasında değişmiştir. En kısa ortalama ölüm zamanı artan sırayla Malathion, 8 mg/L, 6 mg/L, 2 mg/L, 10 mg/L ve 4 mg/L uygulamalarında elde edilmiş ve aralarında farklılıklar istatistiksel olarak önemli

olmamış (p>0,05) ancak bu uygulamalarla diğer uygulamalar (ZnO, bakteri, enzim, su) arasındaki fark önemli (p<0,05) bulunmuştur.

Tablo 3. Uygulamalara Göre Ölüm Oranları ve Ortalama Ölüm Zamanları

Uygulama	Ölüm Oranı (%)	Ortalama Ölüm Zamanı (gün)
2 mg/L	96,000^{a} (±4)	3,103^{d} (±1)
4 mg/L	98,670^{a} (±1)	4,444^{cd} (±2)
6 mg/L	100,00^{a} (±0)	2,387^{d} (±0,4)
8 mg/L	97,330^{a} (±2,7)	2,261^{d} (±1,3)
10 mg/L	94,670^{a} (±1,3)	4,396^{cd} (±1)
Enzim	80,000^{b} (±4,6)	7,148^{c} (±0,4)
Bakteri	78,670^{b} (±3,5)	12,751^{b} (±2,2)
Su	0,000^{c} (±0)	120,00^{a} (±0)
ZnO	96,000^{a} (±2,3)	7,608^{c} (±1,1)
Malathion	100,00^{a} (±0)	1,000^{d}(±0)
Total	84,130	16,510
F değeri (uygulama)	142,01**	1061,10**
Varyasyon katsayısı (%)	5,28	11,76

[1]:Aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar %5 ihtimal seviyesinde önemsiz. **: Çok önemli



Şekil 25. Ölüm oranı ve ortalama ölüm zamanı arasındaki ilişkiyi gösteren grafik

TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikroorganizmaların ve ürettikleri metabolitlerin hasat sonrası tarım ürünlerinde, zararlılara karşı birlikte kullanımına yönelik çevre dostu araştırmalara ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Bakteriler tarafından üretilen kitinazlar, küresel mahsul üretiminde önemli bir risk oluşturan böcek zararlısının gelişmesini engellemektedir. Enzimatik biyokontrol, biyoproses sürecinde tercih edilen çevresel olarak güvenli, uygulanabilir biyoteknolojik bir stratejidir.

Yapılan bu çalışmada, tohumluk mısırın depo şartlarında zararlılar nedeniyle uğradığı verim ve kalite düşüklüğününün en aza indirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, mısır depo zararlısı olarak bilinen *S. zeamais*'ın gelişimi üzerine çinko oksit nanopartikülüne immobilize kitinaz enzimi (*L. coryniformis*'den izole edilen) kullanılarak oluşturulan yeni bir biyonanoformülasyonun etkinliği araştırılmıştır.

GRAS listesine girmiş non-toksik olan *L. coryniformis* (gen bank erişim numarası: MH121153)'den ~ 33 kDa moleküler kütleye sahip kitinaz enzimi ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi ardından HiTrap Capto DEAE kolon (Akta Avant) kullanılarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Daha sonra aktivite için optimum pH ve sıcaklık değerleri, sırasıyla pH 6 ve 65°C olarak bulunmuştur. Shivakumar *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* JN032305'ten 14 kD'lik yeni bir alkalofilik düşük moleküler kütleli kitinaz enzimini kısmen saflaştırmış ve enzim için optimum sıcaklığı 50 °C ve optimum pH 9.0 olarak belirlemişlerdir. Ayrıca Lee *et al.* (2007) *Bacillus sp.* DAU101'den bir kitinaz kodlayan geni *Escherichia coli'*ye klonlamışlardır. Enzimi, GST-füzyon saflaştırma sistemini kullanarak saflaştırmış, pH ve sıcaklık optimal değerlerini sırasıyla 7.5 ve 60 ºC olarak belirlenmiştir. Yahiaoui *et al.* (2019) tarafından yeni bir hücre dışı kitinaz *Paenibacillus timonensis*'den saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler kütlesi 70 kDa olarak aktivite için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 4.5 ve 80 °C olarak belirlenmiştir. Aynı yöntemi kullanan Mohamed *et al.* (2018) *Melghiribacillus thermohalophilus* suşu endokitinaz saflaştırmış ve enzimin moleküler kütlesi 45201,10 Da, pH 3,5 ve 90 °C olarak belirlemiştir. Kudan and Pichyangkura (2009) kitinaz enzimini, *Bacillus licheniformis'den* saflaştırmış enzimin moleküler kütlesi 72 kDa, optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla pH 6-8 ve 50 °C olarak belirlenmiştir. Loni *et al.* (2014) tarafından *Paenibacillus pasadenensis* NCIM 5434 bakterisinden alkalin kitinaz enzimi, saflaştırılmış enzimin moleküler kütlesi yaklaşık 35 kDa, optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla pH 10 ve 37 °C olarak belirlenmiştir. Du *et al.* (2020) tarafından kitinaz üreten *Paenibacillus sp.,*

kitinaz enzimi saflaştırılmış ve molekül ağırlığı sodyum 30 kDa olarak enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 4.5 ve 50 °C olarak belirlenmiştir. Bu çalışmamızın sonucu literatürde yapılan bazı çalışmaların sonuçlarıyla benzerdir (Lee *et al.,* 2007; Kudan and Pichyangkura, 2009; Loni *et al.,* 2014 ; Shivakumar *et al.,* 20014). Bazı çalışmalarda sıcaklık ve pH değerleri farklılık göstermektedir (Mohamed *et al.,* 2018; Yahiaoui *et al.,* 2019; Du *et al.,* 2020).

Çalışmada enzimin ZnO nanopartiküllerine immobilizasyonu sağlanmış ve FTIR, XRD, SEM ve AFM teknikleri kullanılarak karakterizasyonu yapılmıştır. İmmobilize enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri incelenmiş ve optimum aktivitenin görüldüğü pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6.0 ve 65 ^{o}C dir. İmmobilize ve serbest enzim karşılaştırıldığında immobilize enzimin farklı pH ve sıcaklık değerlerinde serbest enzime kıyasla daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar immobilize enzimin serbest enzime göre daha stabil olduğunu kanıtlamaktadır. Farklı çalışmalar da bu bulguyu desteklemektedir (Prasad and Palanivelu, 2014; Prasad and Palanivelu, 2015; Sosnowska *et al.,* 2018; Ismail *et al.,* 2019).

Kitinaz enzimi ile inmobilize edilen ZnO'e ait FTIR spektrumu peptit bağının C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklanan 1641 cm^{-1}'de amid I bağlantısına, N-H bükülme titreşimi/C-N gerilme titerşiminin bir sonucu olarak sırasıyla 1575 ve 1301 cm^{-1}'de amid II ve amid III bağlantılarına ve düzlem dışı N-H bükülme titreşimi içinde 800 cm^{-1}'de amid V bağlantısına karşılık gelen piklerin ortaya çıkmasıyla enzimin varlığını doğrulamaktadır. XRD difraktogramlarında 2θ ölçeğinde 31,7º, 34,4º, 36,5º, 47,7º, 56,6º, 62,8º, 66,5º, 67,9º, 69,4º ve 72,7º'lerde yüksek şiddetlerde gözlenen difraksiyon pikleri sırasıyla çinko oksitin (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) ve (202) düzlemlerdeki yansımalarına karşılık gelmektedir. JCPDS No.74-0576 numaralı karttaki değerlere çok yakın olan bu değerler aynı zamanda ZnO'in enzim ile inmobilize edilmeden önce ve hemde edildikten sonra kristal yöneliminin 2 boyutlu hekzagonal P63mc uzay grubuna sahip wurtzite fazında büyüdüğünü de açık bir şekilde göstererek kitinaz enzimi ile immobilize edilen ZnO'e ait kırınım piklerinin çok sayıda ve şiddetli olması da sentezlenen ürünlerin yüksek kristal özellikte olduğunun ve herhangi bir safsızlık pikine rastlanmaması da ZnO'in kristal yapısının bozulmadığını ifade etmektedir (Lin and Li, 2009; Hooda, 2018a).

Saf ZnO ve kitinaz immobilize ZnO nanopartiküllerinin morfolojik yapısı farklı büyütmelerde SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Bu görüntülerde biyokompozitin, ortalama 18 µm boyutlarına sahip küresel ZnO parçacıklarının yüzeyine yaklaşık 8 µm genişliğindeki kitinaz enziminin tutunduğu açık bir şekilde görülmektedir. Yüksek büyütmeli

olarak (43000x), hazırlanan biyokompozitlere daha yakından bakıldığında ise ilginç bir şekilde her bir mikro ZnO küresinin genişlikleri 10 ile 80 nm aralığında değişen nanoparçacıklardan oluştuğu gözlenmektedir. Aynı zamanda yüksek çözünürlüklü SEM görüntüleri, bu nanoparçacıkların, gözenekli bir yapıdaki enzimin düz yüzeyini de kapladığını çok net bir şekilde göstermektedir. SEM'in yanısıra AFM, enzimle ile modifikasyondan önce ve sonra ZnO parçacıklarının topolojik görünümünü belirlemek için kullanılmış ve nanoölçekteki yüzeyin 3 boyutlu profilinden yararlanılarak ortalama parçacık boyutunun yaklaşık 60 nm olduğu tespit edilmiştir. AFM görüntüleri aynı zamanda kitinaz ile immobilizasyondan önce ve sonraki (Ra:7,1 nm) pürüzlülük derecesinin belirlenmesi içinde kullanılmıştır. AFM ile incelenen yüzey topolojileri, enzim ile modifikasyondan sonra ZnO parçacıklarından oluşan tabaka yapısının belirgin bir değişikliğe uğradığını desteklemektedir. Çıplak ZnO parçacıklarından oluşan tabakanın yüksek orandaki pürüzlü yüzeyinin enzim ilavesi ile daha düzenli bir tabaka yapısı oluşturduğu açık bir şekilde görülmektedir (Zhang and Tan, 2001; Ramanaviciene *et al.,* 2006; Ahmad and Sardar, 2014; Preety and Hooda, 2017). Bunun sebebi olarak kitinaz enzimi ile modifikasyondan sonra ZnO nanoparçacıklarının topaklanma derecesinin azalması gösterilebilir. Sonuç olarak, tarafımızdan hazırlanan enzim temelli bu biyokompozitler için elde edilen FTIR, XRD, AFM ve SEM gibi yapısal ve morfolojik analizler kitinaz enzimin başarılı bir şekilde ZnO yüzeyine tutturulduğunu güçlü bir şekilde ispatlamaktadır. Literatür çalışmaları sonucu elde edilen veriler çalışmamızı destekler niteliktedir (Khooshe-Bast *et al.,* 2016; Hooda, 2018a, 2018b; Sosnowska *et al.,* 2018; Berini *et al.,* 2019; Ismail *et al.,* 2019, Jameel *et al.,* 2020).

Uygulamaların *S. zeamais*'ın ölüm oranına ve ortalama ölüm zamanına olan etkisi tek yönlü varyans (ANOVA) analiziyle, ortalamalar arasındaki farklar ise %5 ihtimal seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testiyle belirlenmiştir. Oluşturulan bütün nanoformülasyon dozları böceklerde ölüme sebep olmuştur. Ölüm oranları dikkate alındığında en yüksek ölüm %100 oranla kimyasal insektisit olan Malathion ile tarafımızdan oluşturulan ve en etkin nanoformülasyon dozu olarak belirlenen 6 mg/L'de görülmüştür. Ölüm zamanları dikkate alındığında Malathion'un 1 günde, etkin olan dozumuzun ise 2 gün gibi kısa bir sürede böceklerin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Nanoformülasyonun bu kadar kısa sürede % 100 lük etki göstermesi kimyasal insektisitle yarışabilir bir nitelikte olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgulara göre ölüm oranı, ortalama ölüm zamanı nanoformülasyon kullanım dozu dikkate alındığında en iyi uygulamanın 6 mg/L olduğu sonucuna varılmıştır.

Oluşturulan biyokontrol ajanı kimyasal insektisitle kıyaslandığında; sürdürülebilir tarımda bitki zararlılarına karşı güçlü etki gösteren, biyolojik olarak parçalanabilen, çevre

dostu ve insan sağlığına olumsuz etkileri olmayan, endüstride kullanılabilirliği yüksek, pestisitlere alternatif ve ülke ekonomisine katkıda bulunabilecek etkili bir biyo-nanoformülasyon olduğu belirlenmiştir.

Kitinaz enzimi ve ZnO partiküllerinin biyoinsektisit olarak kullanılabilirlikleriyle ilgili birçok çalışma yapılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Rouhani et al., 2012; Salem *et al.,* 2015; Patil and Jadhav, 2015; Khooshe-Bast *et al.,* 2016; Athanassiou *et al.,* 2017; Suganthi *et al.,* 2017; Silva *et al.,* 2018; Rafiq *et al.,* 2018; Mansour *et al.,* 2019; Jameel *et al.,* 2020; Mahmood, 2020; Laribi-Habchi *et al.,* 2020). Kitinaz enziminin böcek kütikula ve peritrofik membranında hidrolitik etki göstererek böceğe zarar verdiği ve hatta ölümüne sebep olduğu yapılan farklı çalışmalarda belirlenmiştir (Patil and Jadhav, 2015; Suganthi *et al.,* 2017; Silva *et al.,* 2018; Rafiq *et al.,* 2018; Mahmood, 2020; Laribi-Habchi *et al.,* 2020). ZnO nanopartikülleriyle kararlılığı ve etkinliği arttırılmış olan nanoformülasyonun (ZnONps+Kitinaz) böceğin morfolojik (kitin ihtiva eden) yapısını etkileyerek öldürücü etki göstermiştir.

Sonuç olarak tez çalışmasında,

- *L.* coryniformis'den 33 kDa luk moleküler ağırlığa sahip olan asidik pH (6,0) ve yüksek sıcaklıkta (70 ^{o}C) oldukça aktif ve kararlı bir yapıda enzim saflaştırılmış ve ZnO nanopartikülüne immobilize edilmiştir.
- Oluşturulan nanoformülasyonun in vitro koşullarda, depolanmış mısırın önemli zararlılarından biri olan *S. zeamais*'in biyokontrolünde, yüksek etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.
- Bu Nanoformülasyon tahıl bitkilerinde zararlı *S. zeamais* gelişimini engelleyerek ölümüne neden olduğu belirlenmiştir.

Bu tez; ***L.coryniformis***'den kitinaz enziminin eldesi, yeni bir saflaştırma yönteminin kullanımı ve *S. zeamais*'ın ZnO nanopartikülüne immobilize kitinaz enzimi ile biyokontrol çalışmalarına yönelik ülkemizde yapılan ilk çalışma niteliğindedir. *S. zeamais*'in kontrolünde kullanılabilecek bir biyo- nanoformülasyonun oluşturulması açısından orijinaldir. Oluşturulan formülasyonun ekonomiye destek sağlayacağı ve tarımsal biyoproseslerde biyokontrol temsilcisi olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

Adarkwah, C., Obeng-Ofori, D., Büttner, C., Reichmuth, C., Schöller, M. 2012. Potential of Lariophagus distinguendus (Förster)(Hymenoptera: Pteromalidae) to suppress the maize weevil Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) in bagged and bulk stored maize. Biological Control, 60(2), 175-181.

Ahmad, R., Sardar, M. 2014. Immobilization of cellulase on TiO 2 nanoparticles by physical and covalent methods: a comparative study.

Aliofkhazraei, M., Ali, N. 2014. AFM Applications in Micro/Nanostructured Coatings. Comprehensive Materials Processing, 191–241.

Amidon, G. E., Meyer, P. J., Mudie, D. M. 2017. Particle, Powder, and Compact Characterization. Developing Solid Oral Dosage Forms, 271–293.

Anonim, 2020 Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM). "Bitki Zararlıları Standart İlaç Deneme Metotları". https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/Ambar%20Zararl%C4%B1lar%C4%B1%20Standart%20%20%C4%B0la%C3%A7%20Deneme%20Metotlar%C4%B1.pdf. Son erişim tarihi: 20 Temmuz 2020.

Anonymous, 2021. https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Sitophilus_zeamais_Motschulsky_1855_-_Maize_Weevil.htm (Erişim tarihi: 10 Ekim 2021).

Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., Benelli, G., Losic, D., Rani, P. U., Desneux, N. 2018. Nanoparticles for pest control: current status and future perspectives. Journal of Pest Science, 91(1), 1-15.

Barragán, L. P., Buenrostro-Figueroa, J. J., González, C. A., Marañon, I. 2016. Production, Stabilization, and Uses of Enzymes From Fruit and Vegetable Byproducts. In Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products (pp. 271-286). Elsevier.

Beintema, J. J. 1994. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. FEBS letters, 350(2-3), 159-163.

Berini, F., Casartelli, M., Montali, A., Reguzzoni, M., Tettamanti, G., Marinelli, F. 2019. Metagenome-sourced microbial chitinases as potential insecticide proteins. Frontiers in microbiology, 10, 1358.

Bernal, J. S., Medina, R. F. 2018. Agriculture sows pests: How crop domestication, host shifts, and agricultural intensification can create insect pests from herbivores. Current opinion in insect science, 26, 76-81.

Bhattacharya, D., Nagpure, A., Gupta, R. K. 2007. Bacterial chitinases: properties and potential. Critical reviews in biotechnology, 27(1), 21-28.

Bouacem, K., Laribi-Habchi, H., Mechri, S., Hacene, H., Jaouadi, B., Bouanane-Darenfed, A. 2018. Biochemical characterization of a novel thermostable chitinase from Hydrogenophilus hirschii strain KB-DZ44. International journal of biological macromolecules, 106, 338-350.

Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., Soberón, M. (2011). Bacillus thuringiensis: a story of a successful bioinsecticide. Insect biochemistry and molecular biology, 41(7), 423-431.

Busby, J. N., Landsberg, M. J., Simpson, R. M., Jones, S. A., Hankamer, B., Hurst, M. R., Lott, J. S. 2012. Structural analysis of Chi1 chitinase from Yen-Tc: the multisubunit insecticidal ABC toxin complex of Yersinia entomophaga. Journal of molecular biology, 415(2), 359-371.

Cao, L. 2011. Immobilized enzymes: Comprehensive Biotechnology. 461–476. V. 2.

Cao, L., van Langen, L., Sheldon, R. A. 2003. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?. Current opinion in Biotechnology, 14(4), 387-394.

Chaudhry, Q., Scotter M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L., Aitken, R., Watkins, R. 2008. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. Food Addit. Contam. 25(3), 241-258.

Chen, J. P., Chang, K. C. 1994. Immobilization of chitinase on a reversibly soluble–insoluble polymer for chitin hydrolysis. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology, 60(2), 133-140.

Chen, Y., Ding, H., Sun, S. 2017. Preparation and characterization of ZnO nanoparticles supported on amorphous SiO2. Nanomaterials, 7(8), 217.

Choi, J. M., Han, S. S., Kim, H. S. 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. Biotechnology advances, 33(7), 1443-1454.

Collins, C. H. 1995. Microbiological Methods. London: Butterworths.

Da Silva, R. R., do Couto Santos, R. 2019. Pest Control: Can Chitinases Help To Reduce Pesticide Use?.

Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G. S. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Applied microbiology and biotechnology, 71(6), 773-782.

Damalas, C. A., Koutroubas, S. D. 2018. Current status and recent developments in biopesticide use.

Danho, M., Gaspar, C., Haubruge, E. 2002. The impact of grain quantity on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. Journal of Stored Products Research, 38(3), 259-266.

Danso, J. K., Osekre, E. A., Manu, N., Opit, G. P., Armstrong, P., Arthur, F. H., Mbata, G. 2017. Moisture content, insect pests and mycotoxin levels of maize at harvest and post-harvest in the Middle Belt of Ghana. Journal of Stored Products Research, 74, 46-55.

Du, J., Duan, S., Miao, J., Zhai, M., Cao, Y. 2020. Purification and characterization of chitinase from Paenibacillus sp. Biotechnology and Applied Biochemistry.

Duo-Chuan, L. 2006. Review of fungal chitinases. Mycopathologia, 161(6), 345-360.

El-Shora, H. M., Khalaf, S. A., El-Sheshtawi, S. A. 2017. Biochemical characteristics of immobilized chitinase from Alternaria infectoria. Microbiology Research Journal International, 1-10.

Farré, M., Barceló, D. 2012. Introduction to the Analysis and Risk of Nanomaterials in Environmental and Food Samples. Analysis and Risk of Nanomaterials in Environmental and Food Samples, 1–32.

Fukamizo, T., Sakai, C., Tamoi, M. 2003. Plant chitinases: structure-function relationships and their physiology. Foods & Food Ingredients Journal of Japan, 208(6).

Gadelhak, G. G., El-Tarabily, K. A., Al-Kaabi, F. K. 2005. Insect control using chitinolytic soil actinomycetes as biocontrol agents. Int J Agri Biol, 7(4), 627-633.

Garsa, A. K., Kumariya, R., Sood, S. K., Kumar, A., Kapila, S. 2014. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. Probiotics and antimicrobial proteins, 6(1), 47-58.

Getha, K., Vikineswary, S. 2002. Antagonistic effects of Streptomyces violaceusniger strain G10 on Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 28(6), 303-310.

Giga, D. P., Mutemerewa, S., Moyo, G., Neeley, D. 1991. Assessment and control of losses caused by insect pests in small farmers' stores in Zimbabwe. Crop Protection, 10(4), 287-292.

Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P.,Chhatpar, H. S. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. African Journal of Biotechnology, 5(2), 54-72.

Gomes, R. C., Semedo, L. T. A. S., Soares, R. M. A., Alviano, C. S., And, L. L., Coelho, R. R. R. 2000. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. Letters in Applied Microbiology, 30(2), 146-150.

Grover, A. 2012. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. Critical Reviews in Plant Sciences, 31(1), 57-73.

Gröger, H., Capan, E., Barthuber, A., Vorlop, K. D. 2001. Asymmetric synthesis of an (R)-cyanohydrin using enzymes entrapped in lens-shaped gels. Organic Letters, 3(13), 1969-1972.

Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., Javed, S. 2013. Chitinases: an update. Journal of pharmacy & bioallied sciences, 5(1), 21.

Han, B., Zhou, K., Li, Z., Sun, B., Ni, Q., Meng, X., Zhou, C. 2016. Characterization of the first fungal glycosyl hydrolase family 19 chitinase (NbchiA) from Nosema bombycis (Nb). Journal of Eukaryotic Microbiology, 63(1), 37-45.

Hart, P. J., Pfluger, H. D., Monzingo, A. F., Hollis, T., Robertus, J. D. 1995. The refined crystal structure of an endochitinasefrom Hordeum vulgare L. seeds at 1.8 Å resolution. Journal of molecular biology, 248(2), 402-413.

Hartl, L., Zach, S., Seidl-Seiboth, V. 2012. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. Applied microbiology and biotechnology, 93(2), 533-543.

Hayes, C. K., Klemsdal, S., Lorito, M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., Nakas, J. P., Harman, G. E. 1994. Isolation and sequence of an endochitinase-encoding gene from a cDNA library of Trichoderma harzianum. Gene, 138(1-2), 143-148.

Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., Stevanato, R. 2013. Enzyme immobilization: an update. Journal of chemical biology, 6(4), 185-205.

Hooda, V. 2014. Immobilization and kinetics of catalase on calcium carbonate nanoparticles attached epoxy support. Applied biochemistry and biotechnology, 172(1), 115-130.

Hooda, V. 2018a. A novel polyurethane/nano ZnO matrix for immobilization of chitinolytic enzymes and optical sensing of chitin. *International journal of biological macromolecules*, *106*, 1173-1183.

Hooda, V. 2018b. Enzymes loaded chitosan/coconut fibre/zinc oxide nanoparticles strip for polyamine determination. Food Chemistry, 239, 1100-1109.

Husain, Q., Ullah, M. F. (Eds.). 2019. Biocatalysis: Enzymatic Basics and Applications. Springer Nature.

Inan, T. Y. 2017. Thermoplastic-based nanoblends: preparation and characterizations. In Recent Developments in Polymer Macro, Micro and Nano Blends (pp. 17-56). Woodhead Publishing.

Ishwarya, R., Vaseeharan, B., Kalyani, S., Banumathi, B., Govindarajan, M., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S, Al-Anbr, M. N., Khaled, J. M., Benelli, G. 2018. Facile green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Ulva lactuca seaweed extract and evaluation of their photocatalytic, antibiofilm and insecticidal activity. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 178, 249-258.

Ismail, S. A., Hassan, M. E., Hashem, A. M. 2019. Single step hydrolysis of chitin using thermophilic immobilized exochitinase on carrageenan-guar gum gel beads. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 21, 101281.

Jameel, M., Shoeb, M., Khan, M. T., Ullah, R., Mobin, M., Farooqi, M. K., Adnan, S. M. 2020. Enhanced insecticidal activity of thiamethoxam by zinc oxide nanoparticles: A novel nanotechnology approach for pest control. ACS omega, 5(3), 1607-1615.

Kasthuri, N., Hayworth, K., Lichtman, J., Erdman, N., Ackerley, C. A. 2007. New technique for ultra-thin serial brain section imaging using scanning electron microscopy. Microscopy and Microanalysis, 13(S02), 26-27.

Kezuka, Y., Kojima, M., Mizuno, R., Suzuki, K., Watanabe, T., Nonaka, T. 2010. Structure of full-length class I chitinase from rice revealed by X-ray crystallography and small-angle X-ray scattering. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 78(10), 2295-2305.

Kezuka, Y., Ohishi, M., Itoh, Y., Watanabe, J., Mitsutomi, M., Watanabe, T., Nonaka, T. 2006. Structural studies of a two-domain chitinase from Streptomyces griseus HUT6037. Journal of molecular biology, 358(2), 472-484.

Khooshe-Bast, Z., Sahebzadeh, N., Ghaffarı-Moghaddam, M., Mırshekar, A. 2016. Insecticidal effects of zinc oxide nanoparticles and Beauveria bassiana TS11 on Trialeurodes vaporariorum (Westwood, 1856)(Hemiptera: Aleyrodidae). Acta agriculturae Slovenica, 107(2), 299-309.

Koç, A., Çalışkan, M. 2016. Azotun silaj verimine ve silaj kalitesine etkisi. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 25(Özel Sayı-2), 265-271.

Kołodziejczak-Radzimska, A., Jesionowski, T. 2014. Zinc oxide—from synthesis to application: a review. Materials, 7(4), 2833-2881.

Koul, O. (Ed.). 2019. Nano-biopesticides today and future perspectives. Academic Press.

Kowalczuk, D., Pitucha, M. 2019. Application of FTIR method for the assessment of immobilization of active substances in the matrix of biomedical materials. Materials, 12(18), 2972.

Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W. J. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. Frontiers in Plant Science, 10, 845.

Kress, J., Zanaletti, R., Amour, A., Ladlow, M., Frey, J. G., Bradley, M. 2002. Enzyme accessibility and solid supports: which molecular weight enzymes can be used on solid supports? An investigation using confocal Raman microscopy. Chemistry–A European Journal, 8(16), 3769-3772.

Kudan, S., Pichyangkura, R. 2009. Purification and characterization of thermostable chitinase from Bacillus licheniformis SK-1. Applied biochemistry and biotechnology, 157(1), 23.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. nature, 227(5259), 680-685.

Laribi-Habchi, H., Bouacem, K., Allala, F., Jabeur, F., Selama, O., Mechri, S., Yahiaoui, M., Bouanane-Darenfed, A., Jaouadi, B. 2020. Characterization of chitinase from Shewanella inventionis HE3 with bio-insecticidal effect against granary weevil, Sitophilus granarius Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae). Process Biochemistry.

Laribi-Habchi, H., Bouanane-Darenfed, A., Drouiche, N., Pauss, A., Mameri, N. 2015. Purification, characterization, and molecular cloning of an extracellular chitinase from Bacillus licheniformis stain LHH100 isolated from wastewater samples in Algeria. International Journal of Biological Macromolecules, 72, 1117-1128.

Laznik, Z., Znidarcic, D., Trdan, S. 2011. Control of Trialeurodes vaporariorum (Westwood) adults on glasshouse-grown cucumbers in four different growth substrates: an efficacy comparison of foliar application of Steinernema feltiae (Filipjev) and spraying with thiamethoxamn. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 35(6), 631-640.

Lee, Y., Park, I., Yoo, J., Chung, S., Lee, Y., Cho, Y., Choi, Y. 2007. Cloning, purification, and characterization of chitinase from Bacillus sp. DAU101. Bioresource technology, 98(14), 2734-2741.

Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., Wang, X. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. Computational and structural biotechnology journal, 2(3), e201209017.

Lin, C. C., Li, Y. Y. 2009. Synthesis of ZnO nanowires by thermal decomposition of zinc acetate dihydrate. Materials Chemistry and Physics, 113(1), 334-337.

Liu, Y. L., Yang, Y. H., Yang, H. F., Liu, Z. M., Shen, G. L., Yu, R. Q. 2005. Nanosized flower-like ZnO synthesized by a simple hydrothermal method and applied as matrix for horseradish peroxidase immobilization for electro-biosensing. Journal of Inorganic Biochemistry, 99(10), 2046-2053.

Lobo, M. D. P., Silva, F. D. A., de Castro Landim, P. G., Da Cruz, P. R., De Brito, T. L., De Medeiros, S. C., Grangeiro, T. B. 2013. Expression and efficient secretion of a functional chitinase from Chromobacterium violaceum in Escherichia coli. BMC biotechnology, 13(1), 1-15.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., Henrissat, B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. Nucleic acids research, 42(D1), D490-D495.

Loni, P. P., Patil, J. U., Phugare, S. S., Bajekal, S. S. 2014. Purification and characterization of alkaline chitinase from Paenibacillus pasadenensis NCIM 5434. Journal of basic microbiology, 54(10), 1080-1089.

Lutz, M. P., Michel, V., Martinez, C., Camps, C. 2012. Lactic acid bacteria as biocontrol agents of soil-borne pathogens. Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens, 78, 285-288.

Magnusson, J., Schnürer, J. 2001. Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Applied and Environmental Microbiology, 67(1), 1-5.

Mahmood, S., Kumar, M., Kumari, P., Mahapatro, G. K., Banerjee, N., Sarin, N. B. 2020. Novel insecticidal chitinase from the insect pathogen Xenorhabdus nematophila. International Journal of Biological Macromolecules.15;159:394-401.

Malini, M., Thirumavalavan, M., Yang, W. Y., Lee, J. F., Annadurai, G. 2015. A versatile chitosan/ZnO nanocomposite with enhanced antimicrobial properties. International journal of biological macromolecules, 80, 121-129.

Mansour, S. H., Abdel-Fattah, A. M., Esawy, M. A., Ahmed, E. F., Haroun, A. A., Hussein; M. A., Hassanien, N. M., Khater, H. M. 2019. Immobilization, Thermodynamic studies and Application of Chitinase enzyme from Penicillium chrysogenum. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 23(3), 527-544.

Marchiol, L. 2018. Nanotechnology in agriculture: new opportunities and perspectives. New visions in plant science, 9(4), 161.

Meikle WG; Holst N; Markham RH, 1999. Population simulation model of Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae) in grain stores in West Africa. Environmental Entomology, 28(5):836-844; 35 ref.

Melent'ev, A. I., Helisto, P., Kuz'mina, L. Y., Galimzyanova, N. F., Aktuganov, G. E., Korpela, T. 2006. Use of antagonistic bacilli for biocontrol of fungi degrading fresh wood. Applied Biochemistry and Microbiology, 42(1), 62-66.

Merzendorfer, H., Zimoch, L. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. Journal of Experimental Biology, 206(24), 4393-4412.

Micheva, K. D., Smith, S. J. 2007. Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. Neuron, 55(1), 25-36.

Mohamed, S., Bouacem, K., Mechri, S., Addou, N. A., Laribi-Habchi, H., Fardeau, M. L., Hacène, H. 2018. Purification and biochemical characterization of a novel acido-halotolerant and thermostable endochitinase from Melghiribacillus thermohalophilus strain Nari2AT. Carbohydrate research, 473, 46-56.

Mohammadzadeh, R., Agheshlouie, M., Mahdavinia, G. R. 2017. Expression of chitinase gene in BL21 pET system and investigating the biocatalystic performance of chitinase-loaded AlgSep nanocomposite beads. International journal of biological macromolecules, 104, 1664-1671.

Muzemu, S., Chitamba, J., Mutetwa, B. 2013. Evaluation of Eucalyptus tereticornis, Tagetes minuta and Carica papaya as stored maize grain protectants against Sitophilus zeamais (Motsch.)(Coleoptera: Curculionidae). Agriculture, Forestry and Fisheries, 2(5), 196-201.

Muzzarelli, R. A. 1996. Chitin enzymology. In International Symposium on Chitin Enzymology 1996: Senigallia, Italy). Atec.

Nagpure, A., Choudhary, B., Gupta, R. K. 2014. Mycolytic enzymes produced by Streptomyces violaceusniger and their role in antagonism towards wood-rotting fungi. Journal of Basic Microbiology, 54(5), 397-407.

Naik, K., Mishra, S., Srichandan, H., Singh, P. K., Sarangi, P. K. 2019. Plant growth promoting microbes: potential link to sustainable agriculture and environment. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 21, 101326.

Najafi, S., Pazhouhnia, Z., Ahmadi, O., Berenjian, A., Jafarizadeh-Malmiri, H. 2014. Chitosan nanoparticles and their applications in drug delivery: a review. Curr. Res. Drug Discov, 1, 17-25.

Nukenine, E. N., Monglo, B., Awasom, I., Tchuenguem, F. F. N., Ngassoum, M. B. 2002. Farmers' perception on some aspects of maize production, and infestation levels of stored maize by Sitophilus zeamais in the Ngaoundere region of Cameroon. Cam J Biol Biochem Sci, 12, 18-30.

Ojo, J. A., Omoloye, A. A. 2016. Development and life history of Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae) on cereal crops. Advances in Agriculture, 2016.

Okongo, R. N., Puri, A. K., Wang, Z., Singh, S., Permaul, K. 2019. Comparative biocontrol ability of chitinases from bacteria and recombinant chitinases from the thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus. Journal of bioscience and bioengineering, 127(6), 663-671.

Omkar, O., Kumar, B. 2016. Biocontrol of Insect Pests. Ecofriendly Pest Management for Food Security, 25–61.

Ong, L. G., Lam, H. K., Lim, M. Y., Tan, T. X. 2017. Process optimization on chitinase production by locally isolated Enterobacter sp. and Zymomonas sp. Int J Chem Eng Appl, 8, 286-289.

Oyeleye, A., Normi, Y. M. 2018. Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. Bioscience reports, 38(4).

Özata, E., Geçit, H. H., Kincikarakaya, S. Ü. 2016. Orta Karadeniz Ekolojik Koşullarında Şeker Mısırda (Zea mays saccharata Sturt.) Değişik Ekim Sıklıkları ve Azot Dozlarının Verim Öğelerine Etkisi. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 25(ÖZEL SAYI-1), 74-80.

Özcan, S. 2009. Modern dünyanın vazgeçilmez bitkisi mısır: genetiği değiştirilmiş (transgenik) mısırın tarımsal üretime katkısı. Turkish Journal of Scientific Reviews, 2(2), 01-34.

Parisi, C., Vigani, M., Rodríguez-Cerezo, E. 2015. Agricultural nanotechnologies: what are the current possibilities?. Nano Today, 10(2), 124-127.

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

Patil, R. S., Ghormade, V., Deshpande, M. V. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. Enzyme and microbial technology, 26(7), 473-483.

Prapagdee, B., Kuekulvong, C., Mongkolsuk, S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by Streptomyces hygroscopicus against phytopathogenic fungi. International Journal of Biological Sciences, 4(5), 330.

Prasad, M., Palanivelu, P. 2014. A novel method for the immobilization of a thermostable fungal chitinase and the properties of the immobilized enzyme. Biotechnology and Applied Biochemistry, 61(4), 441-445.

Prasad, M., Palanivelu, P. 2015. Immobilization of a thermostable, fungal recombinant chitinase on biocompatible chitosan beads and the properties of the immobilized enzyme. Biotechnology and applied biochemistry, 62(4), 523-529.

Preety, Hooda, V. 2017. Increasing the efficiency of immobilization and chitin determination using copper oxide nanoparticles. Talanta, 168, 246–256.

Purushotham, P., Podile, A. R. 2012. Synthesis of long-chain chitooligosaccharides by a hypertransglycosylating processive endochitinase of Serratia proteamaculans 568. Journal of bacteriology, 194(16), 4260-4271.

Rafiq, M., Hussain, A., Shah, K. H., Saeed, Q., Sial, M. U., Ali, Z., Akrem, A. 2018. Computational modeling and functional characterization of a GgChi: A class III chitinase from corms of Gladiolus grandiflorus. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 34(12), 673-683.

Ramanaviciene, A., Schuhmann, W., Ramanavicius, A. 2006. AFM study of conducting polymer polypyrrole nanoparticles formed by redox enzyme–glucose oxidase–initiated polymerisation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 48(2), 159-166.

Rasmussen, J. W., Martinez, E., Louka, P., Wingett, D. G. 2010. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. Expert opinion on drug delivery, 7(9), 1063-1077.

Rathore, A. S., Gupta, R. D. 2015. Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives. Enzyme research, 2015.

Redinbaugh, M. G., Zambrano, J. L. 2014. Control of virus diseases in maize. Advances in virus research, 90, 391-429.

Rouhani, M., Samih, M. A., Kalantari, S. 2012. Insecticide effect of silver and zinc nanoparticles against Aphis nerii Boyer De Fonscolombe (Hemiptera: Aphididae). Chilean journal of agricultural research, 72(4), 590.

Ruszkiewicz, J. A., Pinkas, A., Ferrer, B., Peres, T. V., Tsatsakis, A., Aschner, M. 2017. Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review. Toxicology Reports, 4, 245-259.

Sachdeva, V., Hooda, V. 2016. Effect of changing the nanoscale environment on activity and stability of nitrate reductase. Enzyme and Microbial Technology, 89, 52-62.

Sahai, A. S., Manocha, M. S. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host—parasite interaction. FEMS Microbiology Reviews, 11(4), 317-338.

Salem, A. A., Hamzah, A. M., El-Taweelah, N. M. 2015. Alumınum And Zınc Oxıdes Nanopartıcles As A New Methods For Controllıng The Red Flour Beetles, *Tribolium Castaneum* (Herbest) Compared To Malathıon Insectıcıde. Journal of Plant Protection and Pathology, 6(1), 129-137.

Sandhu, S.S., Sharma, A.K., Beniwal, V., Goel, G., Batra, P., Kumar, A., Jaglan, S., Malhotra, S. 2012. Myco-biocontrol of insect pests: factors involved, mechanism, and regulation. Journal of Pathogens, 2012.

Sarıbuga, E., Nadaroglu, H., Dikbas, N., Senol, M., Cetin, B. 2014. Purification, characterization of phytase enzyme from Lactobacillus plantarum bacteria and determination of its kinetic properties. African Journal of Biotechnology, 13(23).

Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N., Kotan, R. 2014. Purification of Chitinase enzymes from Bacillus subtilis bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against Fusarium culmorum. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, 13(1), 35.

Sharma, N., Sharma, K. P., Gaur, R. K., Gupta, V. K. 2011. Role of chitinase in plant defense. Asian Journal of Biochemistry, 6(1), 29-37.

Sheldon, R. A. 2011. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. Organic Process Research & Development, 15(1), 213-223.

Sheldon, R. A., van Pelt, S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. Chemical Society Reviews, 42(15), 6223-6235.

Shivakumar, S., Karmali, A. N., Ruhimbana, C. 2014. Partial purification, characterization, and kinetic studies of a low-molecular-weight, alkali-tolerant chitinase enzyme from Bacillus subtilis JN032305, a potential biocontrol strain. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 44(6), 617-632.

Silva, N. C., Conceição, J. G., Ventury, K. E., De Sá, L. F., Oliveira, E. A., Santos, I. S., Oliveira, A. E. 2018. Soybean seed coat chitinase as a defense protein against the stored product pest Callosobruchus maculatus. Pest management science, 74(6), 1449-1456.

Singh, R. S., Singh, T., Pandey, A. 2019. Microbial enzymes—an overview. In Advances in Enzyme Technology (pp. 1-40). Elsevier.

Sinha Ray, S. 2013. Techniques for characterizing the structure and properties of polymer nanocomposites. Environmentally Friendly Polymer Nanocomposites, 74–88.

Smijs, T. G., Pavel, S. 2011. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. Nanotechnology, science and applications, 4, 95.

Sosnowska, M. E., Jankiewicz, U., Kutwin, M., Chwalibog, A., Gałązka, A. 2018. Influence of salts and metal nanoparticles on the activity and thermal stability of a recombinant chitinase from Stenotrophomonas maltophilia N4. Enzyme and microbial technology, 116, 6-15.

Stathers, T. E., Arnold, S. E., Rumney, C. J., Hopson, C. 2020. Measuring the nutritional cost of insect infestation of stored maize and cowpea. Food Security, 1-24.

Stoykov, Y. M., Pavlov, A. I., Krastanov, A. I. 2015. Chitinase biotechnology: production, purification, and application. Engineering in Life Sciences, 15(1), 30-38.

Suganthi, M., Senthilkumar, P., Arvinth, S., KN, C. 2017. Chitinase from Pseudomonas fluorescens and its insecticidal activity against Helopeltis theivora. *The Journal of general and applied microbiology*, 63(4), 222–227.

Suginta, W., Sirimontree, P., Sritho, N., Ohnuma, T., Fukamizo, T. 2016. The chitin-binding domain of a GH-18 chitinase from Vibrio harveyi is crucial for chitin-chitinase interactions. International journal of biological macromolecules, 93, 1111-1117.

Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Watanabe, T. 2002. Chitinases A, B, and C1 of Serratia marcescens 2170 produced by recombinant Escherichia coli: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 66(5), 1075-1083.

Taira, T., Mahoe, Y., Kawamoto, N., Onaga, S., Iwasaki, H., Ohnuma, T., Fukamizo, T. 2011. Cloning and characterization of a small family 19 chitinase from moss (Bryum coronatum). Glycobiology, 21(5), 644-654.

Trematerra, P., Valente, A., Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G. 2007. Kernel-kernel interactions and behavioral responses of Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Applied Entomology and Zoology, 42(1), 129-135.

TÜİK, 2020. https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-Istatistikleri-2020-33737 (Erişim tarihi: 12 Ocak 2021).

Ubhayasekera, W., Rawat, R., Ho, S. W. T., Wiweger, M., Von Arnold, S., Chye, M. L., Mowbray, S. L. 2009. The first crystal structures of a family 19 class IV chitinase: the enzyme from Norway spruce. Plant molecular biology, 71(3), 277-289.

Umemoto, N., Kanda, Y., Ohnuma, T., Osawa, T., Numata, T., Sakuda, S., Taira, T., Fukamizo, T. 2015. Crystal structures and inhibitor binding properties of plant class V chitinases: the cycad enzyme exhibits unique structural and functional features. The Plant Journal, 82(1), 54-66.

Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sørlie, M., Eijsink, V. G. 2013. The chitinolytic machinery of Serratia marcescens–a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. The FEBS journal, 280(13), 3028-3049.

Vaghari, H., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mohammadlou, M., Berenjian, A., Anarjan, N., Jafari, N., Nasiri, S. 2016. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. Biotechnology letters, 38(2), 223-233.

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

Van de Velde, F., Lourenço, N. D., Pinheiro, H. M., Bakker, M. 2002. Carrageenan: A food-grade and biocompatible support for immobilisation techniques. Advanced Synthesis & Catalysis, 344(8), 815-835.

Vásquez-Castro, J. A., De Baptista, G. C., Gadanha, C. D., Trevizan, L. R. P. 2012. Insecticidal effect and residual action of fenitrothion and esfenvalerate on Sitophilus oryzae and S. zeamais (Coleoptera: Curculionidae) in stored maize and wheat. International Scholarly Research Notices, 2012.

Veliz, E. A., Martínez-Hidalgo, P., Hirsch, A. M. 2017. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. AIMS microbiology, 3(3), 689.

Verma, D., Fortunati, E. 2019. Biopolymer processing and its composites: An introduction. In Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy (pp. 3-23). Woodhead Publishing.

Watanabe, T., Ito, Y., Yamada, T., Hashimoto, M., Sekine, S., Tanaka, H. 1994. The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from Bacillus circulans WL-12 in chitin degradation. Journal of bacteriology, 176(15), 4465-4472.

Whalon, M. E., Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R. M. 2008. Analysis of global pesticide resistance in arthropods. Global pesticide resistance in arthropods, 5, 31.

Wyckhuys, K. A. G., Hughes, A. C., Buamas, C., Johnson, A. C., Vasseur, L., Reymondin, L. Deguine, J.P., Sheil, D. 2019. Biological control of an agricultural pest protects tropical forests. Communications biology, 2(1), 1-8.

Xi, H., Yu, J., Sun, Q., Lu, J., Gu, T., Guo, X., Lia, B., Chena, X., Zhanga, K., Kong, W., Wu, Y. 2018. Expression and purification of pneumococcal surface protein a of clade 4 in Escherichia coli using hydroxylapatite and ion-exchange column chromatography. Protein expression and purification, 151, 56-61.

Yahiaoui, M., Laribi-Habchi, H., Bouacem, K., Asmani, K. L., Mechri, S., Harir, M., Jaouadi, B. 2019. Purification and biochemical characterization of a new organic solvent-tolerant chitinase from Paenibacillus timonensis strain LK-DZ15 isolated from the Djurdjura Mountains in Kabylia, Algeria. Carbohydrate research, 483, 107747.

Yang, J., Gan, Z., Lou, Z., Tao, N., Mi, Q., Liang, L., Sun, Y., Guo, Y., Huang, X., Zou, C., Rao, Z., Meng, Z., Zhang, K.Q. 2010. Crystal structure and mutagenesis analysis of chitinase CrChi1 from the nematophagous fungus Clonostachys rosea in complex with the inhibitor caffeine. Microbiology, 156(12), 3566-3574.

Zhang, J., Khan, S. A., Hasse, C., Ruf, S., Heckel, D. G., Bock, R. 2015. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science*, *347*(6225), 991-994.

Zhang, P., Tan, W. 2001. Atomic force microscopy for the characterization of immobilized enzyme molecules on biosensor surfaces. Fresenius' journal of analytical chemistry, 369(3), 302-307.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Sevda UÇAR
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Çat Çok Programlı Anadolu Lisesi
Lisans:	Atatütk Üniversitesi /Ziraat fakültesi/ Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü
Yüksek lisans:	Atatütk Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstütüsü/ Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı/Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilimdalı
Doktora:	-
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
-	