



UYARI: Proje örnekleri; bütünlük arzeden ideal bir proje anlamına gelmemekle birlikte, araştırmacılara proje yazımında yardımcı olmak ve fikir vermek amacı ile daha önce TÜBİTAK'a sunulan çeşitli projelerin Özet/Abstract, Amaç ve Hedefler, Konu, Kapsam ve Literatür Özeti, Özgün Değer, Yöntem, Proje Yönetimi, Ekip ve Araştırma Olanakları ile Yaygın Etki bölümlerinden alıntılar yapılarak oluşturulmuştur.

1001 – BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA PROJELERİNİ DESTEKLEME PROGRAMI

Başvurunun bilimsel değerlendirmeye alınabilmesi için, Arial 9 yazı tipinde hazırlanması ve toplamda 20 sayfa geçmemesi gerekmektedir. (EK-1 ve EK-2 hariç) (*)

Araştırma proje önerisi değerlendirme formuna
http://www.tubitak.gov.tr/tubitak_content_files/ARDEB/destek_prog/danisman_panelist/DA_Panelist_Proje_Onerisi_Degerlendirme_Formu.doc
adresinden ulaşabilirsiniz.

1. PROJE ÖZETİ

Proje başlığı, özeti ve anahtar kelimeler Türkçe ve İngilizce yazılmalıdır. **Proje özetleri birer sayfayı geçmemelidir.** Özet (summary) projenin soyut bir tanıtımı değil, ana hatları ile önerilen projenin:

- Amacı,
- Konunun kısa bir tanıtımı, neden bu konunun seçildiği ve özgün değeri,
- Kuramsal yaklaşım ve kullanılacak yöntemin ana hatları,
- Ulaşılmak istenen hedefler ve beklenen çıktılarının bilimsel, teknolojik ve sosyo-ekonomik ne tür katkılarda bulunabileceği

hususlarında ayrı paragraflar halinde kısa ve net cümlelerle bilgi verici nitelikte olmalıdır.

Anahtar Kelimeler ve İngilizce karşılıkları (keywords) uluslararası literatüre uygun bir şekilde seçilerek özet sayfasının sonundaki ilgili bölümde ayrıca belirtilmelidir.

Proje Başlığı : xxx

Proje Özeti

Veteriner Çalışma Alanı Örneği:

Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı virüsü (KKKAHV) Bunyaviridae ailesinin Nairovirüs genusunda bulunan ve kenelerle nakledilen bir virüstür. KKKAHV negatif anlamlı, 3 segmentli ve tek iplikçikli RNA virüsü olup segmentleri ayrı ayrı kapsüle olmaktadır. Virionun yapısında RNA'ya bağlı RNA polimeraz enzimi (L segmenti), yüzey glikoproteinleri Gn ve Gc (M segment) ve nükleoprotein NP (S segment) bulunmaktadır. KKKAHV Asya, Afrika, Ortadoğu ve Doğu Avrupa'da görülen ve yüksek mortaliteyle karakterize bir hastalıktır. Virüs insanlara, enfekte kenelerin insanları tutması ya da viremik hayvan ve insanlarla direkt temas şeklinde nakledilmektedir. Ülkemizde ilk klinik vakalar 2002 yılında görülmüştür. Vaka sayıları takip eden yıllar artarak devam etmiş ve önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. Ülkemizde, 2002-2012 yılları arasında 7000'in üzerinde vaka rapor edilmiş ve mortalite oranının %5 olduğu saptanmıştır. Türkiye, dünyada en büyük KKKAHV salgınlığının görüldüğü ülke olup zaman içerisinde KKKAHV epidemileri artmış ve daha geniş bir coğrafyaya yayılmıştır.

Enfeksiyöz hastalıklarının kontrolünde en etkili yol aşılardır. Viral aşılar, sağlık alanında 20. yüzyılın en önemli buluşlarından birisi olup uygulama alanı bulmasıyla hastalıklara maruz kalma ve enfeksiyonlara bağlı ölümlerin önüne geçilmiştir. KKKAHV'ın spesifik bir tedavisi ve koruyucu bir aşısı bulunmamaktadır. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun (TÜBİTAK) desteklediği bir proje kapsamında KKKAHV'a karşı, çalışma grubumuz tarafından hücre kültürü tabanlı inaktif bir aşı geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda aşı uygulanan Balb/c farelerinde yüksek düzeyde nötralizan antikorların oluştuğu saptanmıştır. Daha da önemlisi aşılanan IFNAR farelerinin KKKAHV Kelkit06 suşu ile epruvasyonunda %80'lik koruma oranının olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, geliştirilen aşının hücresel immun yanıtı ne şekilde uyardığı proje kapsamında yer almadığı için bilinmemektedir. Bu çalışmayla, aşılanan Balb/c farelerinde KKKAHV Kelkit06 suşuna ait NP ve Gn proteinlerinin, T hücrelerini uyaran immunodominant bölgeleri belirlenecektir. Bu amaçla, örtüşen (overlap) NP ve Gn peptit havuzları IFN- γ ELISPOT testi ile analiz edilecektir. Daha sonra Balb/c fareleri, KKKAHV inaktif aşısı ile çeşitli dozlarda immunize edilecek ve aşıya bağlı T hücre yanıtı araştırılacaktır. IFN- γ yanıtı ELISPOT testi ile, CD4+, CD8+ and CD3 + T hücreleri akış sitometrisi ile analiz edilecektir. Sitokin ELISA testi ile IFN- γ , TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-5 ve IL-10 sitokin yanıtları belirlenecektir. Ayrıca, indirekt ELISA ve pseudo-plak redüksiyon nötralizasyon testi (PPRNT) ile aşıya bağlı humoral immun yanıtı araştırılacak ve böylece KKKAHV aşısı tarafından oluşturulan hem hücresel hem de humoral yanıt belirlenmiş olacaktır.

Su Ürünleri Çalışma Alanı Örneği :

Yersinioz ve Vibriosiz hastalıkları sırasıyla Türkiye'de tatlısu ve deniz balıkları yetiştiriciliğinde en çok balık kaybına neden olan iki hastalıktır. *Yersinia ruckeri* alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) yersinioz hastalığının, *Listonella anguillarum* (*Vibrio anguillarum*) ise deniz balıklarında vibriosiz hastalığının etkenidir. Bu hastalıklardan kaynaklanan kayıpları önlemek için farklı antibiyotikler yada inaktive edilmiş aşılar kullanılmakta fakat bakterilerin antibiyotiğe direnç oluşturması ve inaktif aşıların yeterli korumayı sağlayamaması nedeniyle istenen oranda başarı sağlanamamaktadır. Ekibimizin uzun dönemdeki amacı; Türkiye'de balık hastalıkları nedeniyle oluşan kayıpları en aza indirmektir. Bu projenin amacı ise yersinioz ve vibriosiz hastalıklarına karşı



canlı atenüe asırlar geliştirmektedir. Bu amaçla, *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* bakterilerinin *aroA* ve *aroC* genleri mutasyona uğratılacak ve mutan bakterilerin balıklardaki hastalık yapma gücü (virülans) ve hastalık koruma etkinlikleri (efikasite) belirlenecektir. Temel hipotezimiz; genel aromatik amino asit biyosentez ağı (*aro*) genleri mutasyona uğratılan *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* balıklarda çoğalma ve hastalık yapma yeteneklerini kaybedecekler ve canlı aşı olarak kullanılabileceklerdir.

Aşağıdaki spesifik hedefler izlenerek, projenin amacına başarılı bir şekilde ulaşması sağlanacaktır.

1. *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* bakterilerinin *aroA* ve *aroC* genlerinin mutasyona uğratılması: *Y. ruckeri* RB0708 ve *L. anguillarum* LMG10861 bakterilerinin *aroA* (5-enolpiruvilshikimate-3-fosfat sintaz) ve *aroC* (2,3-dihidroksibenzoik asit) genlerinin 5' ve 3' bölgeleri amplifike edilecek ve daha sonra overlap PZR yöntemi ile mutasyona uğratılan bu genler özel bir plazmide (pDS132) yerleştirilecektir. Bu plazmid *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum*'a aktarılacak ve çift homolog rekombinasyon sonucu wild tip genler mutan genlerle yer değiştirecektir. Bu aşamanın başarıyla tamamlanması sonucu hastalık yapma etkinliği azaltılmış yada yok edilmiş aşı adayları suşlar elde edilecektir.

2. Mutant *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* bakterilerinin balıklar üzerindeki virülans ve efikasite özelliklerinin belirlenmesi: Elde edilen mutant *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum*'un alabalıklarda yersinioz ve vibriosiz oluşturma potansiyelleri, balıkların mutant bakterilerle enfekte edilmesi, ölüm oranlarının hesaplanması ve bağışıklık sisteminde moleküler düzeyde oluşan tepkinin ölçülmesi ile belirlenecektir. Mutant *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum*'un genç alabalıklarda yersiniyöz ve vibriosize karşı koruma sağlayıp sağlamadığı ise aşılama yapılan balıkların 1, 3, 6, 9, 12 ay sonra yabancı tip *Y. ruckeri* RB0708 ve *L. anguillarum* LMG10861 ile enfekte edilmesi ile anlaşılacaktır.

Bu atenüe canlı aşıların alabalıklarda hastalık yapan yabancı tip *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* a karşı büyük oranda bağışıklık kazanımı sağlaması ve dolayısıyla hastalık oluşum ve yayılımını engellemesi beklenmektedir. Bu çalışmaların başarıyla tamamlanması sonucunda, balık yetiştiriciliğinde hastalıklar nedeniyle oluşan kayıpların büyük oranda azalması ve yetiştiriciliğin karlılığının artması beklenmektedir. Balık hastalıklarıyla klasik yöntemlerle mücadele genellikle etkisiz ve çok pahalı olmaktadır. Kullanılan antibiyotiklere karşı bakterilerde direnç oluşumu ya da kimyasal maddelerin evre kirliliğine sebep olması ise diğer istenmeyen durumlardan bazılarıdır. Bu nedenlerden dolayı, balık hastalıklarıyla aşılamaya dayalı stratejiler kullanarak mücadele edilmesi, su ürünleri üretiminin güvenliğinin ve devamlılığının sağlanması açısından oldukça önemlidir. Bu projenin Türkiye su ürünleri üretim sektörünün gelişmesine katkıda bulunması ve yerli aşı üretim çalışmalarına öncülük etmesi beklenmektedir.

Tarım alışma Alanı rneği:

Biyoekonomik zenginliklerimiz içerisinde yer alan bitki gruplarından birisi, her biri ayrı bir güzellikte çiçeğe sahip olan türlerin yer aldığı yumrulu ve soğanlı bitkiler (geofitler) grubudur. Geofitlerin önemli bir kısmı ss bitkisi olarak kullanıldığı gibi, parfümeri ve ilaç sanayinde de önemli bir potansiyele sahiptir. nemli geofitlerden olan *Crocus* türleri, Iridaceae familyasına ait olup, sonbaharda ve ilkbaharda aan güzel ve hoş kokulu çiçeklerinden dolayı oldukça değerli ss bitkileridir. Ülkemizde 19'u endemik olmak üzere 35 *Crocus* türü mevcuttur. Bazı türler 2 ile 10 arasında değişen alt türü bulunmaktadır. *Crocus* türleri içinde kaybolma tehlikesi yüksek olan ve güzel aynı zamanda gösterişli çiçekleri ile en önemli türlerden biri olan *Crocus speciosus* Bieb. türünün Türkiye florasında üç alt türü bulunmaktadır. Bu üç alt türün öncelikle kültüre alınarak alternatif yöntemlerle çoğaltılması büyük önem taşımaktadır. Doğal oğalma hızının da nisbeten düşük olması bu bitki türlerinin kültüre alınmasında karşılaşılan en büyük problemdir. Bundan dolayı bu taksonların hızlı çoğaltılabilmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesini zorunludur. *In vitro* teknikler kullanılarak kısa sürede çok sayıda soğancık üretimi mümkün olabilmektedir. Teklif edilen proje kapsamında da, endemik ve ss bitkisi olarak önemli potansiyele sahip olan ve endemik-tehlike altında bulunan *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türleri ile *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türü ilk defa tarla koşullarında kültüre alınacak olup, her üç alt türde ilk kez *in vitro* kültürü ve soğancık üretimi yapılacaktır. Bu amaçla, doğal floradan toplanan *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türleri ile *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* eşitli yetiştirme teknikleri kullanılarak tarla koşullarında kültüre alınacaktır. Ayrıca türlerine ait çeşitli organ eksplantları, farklı besin ortamlarında ve kültür koşullarında *in vitro* soğancık üretimi çalışmaları yapılacaktır. Bu proje kapsamında bu bitkilerin dış şartlara alıştırılmaları ve toprağa aktarımları da optimize edilecektir. Süs bitkisi olarak ekonomik potansiyeli bulunan *Crocus speciosus* türüne ait bu üç alt türün kültüre alınmasıyla, doğal yetişme alanlarında yapılan skmlerin önüne geçilebilecek, yok olmalarına yönelik tehditler ortadan kalkabilecek ve lk ekonomisine ve germplazmın korunmasına katkılar sağlanabilecektir.

Orman alışma Alanı rneği :

Nanokompozitler yeni bir sınıf kompozit olup, polimer matrisler içerisinde kullanılan takviye edici materyal yapıların en azından bir boyutunun 100 nanometre lğinden ufak olmaktadır. Günümüze kadar yapılan nanokompozit alanındaki çalışmaların büyük bir kısmında takviye edici olarak nano boyutta inorganik materyaller kullanılmıştır. Genelde kullanılan bu nano boyuttaki inorganik materyaller arasında başlıca kil, silika ve TiO₂ gelmektedir. Polimer nanokompozitlerde takviye elemanı olarak kullanılan inorganik yapılarıdaki bu çeşitliliğe rağmen, nanokompozit üretimi için yenilenebilir kaynaklardan evre dostu takviye elemanı eşitleri son yıllarda araştırma konusu olmuştur. Son on yıl içerisinde biyo-kökenli yenilenebilir kaynaklardan elde edilen organik takviye maddelerin kullanımına başlanmış ve bu yönde yapılan çalışmaların sayıları artış göstermiştir. Lignoselülozik kaynaklar, çeşitli deniz hayvanları (*tunicin*, *chitin*) ve bakteri selülozundan elde edilen selüloz kristalitleri (*whiskers*) doğal nano takviye elemanları arasında en önemlisidir. Büyük çapta üretim gerçekleştirilebilmesi için takviye malzemenin matris içerisinde iyi bir dağılım göstermesi gerekmektedir.

Bu projede selüloz nanokristalit takviye edilmiş polimer nanokompozitlerin üretiminin gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.



Nanokompozit üretimi için mikrokristal selülozdan (MCC) asit hidrolizi yoluyla nano ölçekte selüloz nanokristalit (*whiskers*) eldesi gerçekleştirilecektir. Elde edilen nanokristalitlerin (*whiskers*) yapıları ve boyutları atomik güç mikroskopu (AFM), X-ray, ¹³C CP-MAS, NMR ve FTIR analizleri ile karakterize edilecektir. Selüloz nanokristalitlerin termoplastik polimer matrisler içerisinde takviye elemanı olarak kullanımının kısıtlı olması hidrofilik karakterde olmalarından kaynaklanmaktadır. Bu hidrofilik yapı nedeniyle termoplastik matris içerisinde homojen karışım gösterememekte ve uyum problemleri yaşanmaktadır. Bu nedenle nanokompozit üretimi öncesi selüloz nanokristalitlerin yapılarının kimyasal modifikasyon işlemi ile değiştirilmesi zorunlu olmaktadır. Selüloz nanokristalitleri farklı zincir uzunluğuna sahip dört anhidrit (asetik, bütirik, dekanolik ve stearik anhidritler) ile kimyasal modifikasyon ve farklı dört vinil ester (vinil asetat, vinil bütirat, vinil stearat ve vinil dekanolat) ile transesterifikasyon reaksiyonlarla hidrofobik hale getirilecektir. Selüloz nanokristalitleri kristal yapı bozulmaksızın farklı yöntemlerle ve farklı zincir uzunluğuna sahip gruplar ile yapıları değiştirilerek termoplastik matris ile uyumlu hale getirildikten sonra farklı oranlarda nano boyutta selüloz nanokristalit takviyeli nanokompozitlerin üretilmesi hedeflenmektedir. Polimer matris olarak erime sıcaklığı selülozik materyalin bozunma sıcaklığının altında olan (120-130°C arasında) yüksek yoğunlukta polietilen (HDPE) kullanılması planlanmaktadır. Ülkemizde yapılan proje, araştırma ve çalışmalarda orman ürünleri alanında nanoboyutta selüloz nanokristalitleri kullanarak nanokompozit üretimi ile ilgili henüz nano ölçekte bir çalışmaya rastlanmamış olup, yenilebilir kaynaklardan nanokompozitlerin üretimi gerçekleştirilerek, ülkemizde orman ürünleri sanayii alanında nano teknoloji konusunda bir ilk gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelime Örnekleri:

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı, hücre tabanlı inaktif aşı, KKKAHV NP ve Gn spesifik T hücre immunodominat bölgeler, aşıya bağlı hücresel ve humoral immunité.

Aromatik amino asit biyosentez ağı (aro), aroA, aroC, aroB, aroD, aroE, overlap PZR, canlı atenüé aşı, *Yersinia ruckeri*, *Listonella anguillarum*

Nanokompozit, selüloz nanokristalitleri (*whiskers*), kimyasal modifikasyon, transesterifikasyon, termoplastik

Project Title : xxx

Project Summary

Veteriner Çalışma Alanı Örneği:

Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) is a tick-borne virus in the family Bunyaviridae, genus Nairovirus. The CCHFV genome consists of three molecules of negative-sense single-stranded RNA, each encapsulated separately. The virion particle contains viral RNA polymerase (L segment), surface glycoproteins Gn and Gc (Msegment), and a nucleocapsid protein NP (S segment). CCHF is characterized by high case mortality, occurring in Asia, Africa, the Middle East and Eastern Europe. The virus is transmitted to humans through infected tick bites or from direct contact with viremic animals or humans. Clinical CCHF was first recognized in Turkey in 2002. The numbers of CCHF cases have gradually increased in Turkey making the virus a public health concern. Between 2002 and 2012, more than 7000 the CCHF cases have been reported in Turkey and mortality rate is around 5%. So, Turkey is one of the country where the epidemic has become spread to the wider geography and the biggest outbreaks of CCHF have occurred in the world.

Vaccines are the most effective way to control infectious diseases. Viral vaccines could be considered among the most important medical achievements of the 20th century. They have prevented much suffering and saved many lives. Currently there are no specific treatments or licensed vaccines available for CCHF. Our group has recently developed an inactivated cell-culture based vaccine against CCHF which has been supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK). We have showed that the Balb/c mice immunized with the CCHF vaccine induced high level of neutralizing antibodies. Furthermore, the challenge infection of IFNAR mice with CCHFV Kelkit06 virus presented a survival rate of 80%. However, we could not evaluate the vaccine-induced T cell responses because the scope of the project does not cover the analysis of cellular immune responses induced by the vaccine. In this research, Balb/c mice will be immunized with the vaccine and it will be determined to the immunodominant regions of nucleoprotein (NP) and glycoprotein (Gn) of CCHFV Kelkit06 strain which stimulate T cells. For this purpose, pools of overlapping NP and Gn peptides will be used for an IFN- γ ELISPOT assay. Then, in order to analyze the vaccine-induced T cell responses in Balb/c mice immunized with varying doses of the vaccine, we will examine the production of IFN- γ by IFN- γ ELISPOT assay and CD4+, CD8+ and CD3 + T cells by flow cytometry. Cytokine ELISA will be performed to determine the multiple cytokines such as IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 and IL-10. We will also investigate the humoral immune response in the vaccinated Balb/c mice groups by indirect ELISA and pseudo-plaque reduction neutralization test (PPRNT). So, we will able to assess both humoral and cellular immunity induced by the CCHF vaccine.

Su Ürünleri Çalışma Alanı Örneği :

Yersinia ruckeri and *Listonella anguillarum* cause yersiniosis and vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), respectively. These two bacterial diseases are the main causes of high mortalities and severe economic losses in freshwater and marine aquaculture in Turkey. To treat and prevent these diseases, antibiotics and inactive vaccines have been used.

However, use of antibiotics can cause antibiotic resistance in bacteria, while inactive vaccines do not provide prolonged protection against yersiniosis and vibriosis. Our long term goal is to prevent fish diseases in Turkey. The objective of this research is to develop live attenuated vaccines against yersiniosis and vibriosis. To this aim, *aroA* and *aroC* genes of *Y. ruckeri* and *L. anguillarum* will be mutated and virulence and efficacy of these mutants will be characterized. Our main hypothesis is that *Y. ruckeri* and *L. anguillarum* with mutations in their aromatic amino acid biosynthesis network (*aro*) will lose their ability to cause infections in fish and these will be used as live vaccines.

To accomplish the aim of this research, we will complete the following specific objectives.

1. **Mutation of *Y. ruckeri* and *L. anguillarum* *aroA* *aroC* genes:** : 5' and 3' regions of *Y. ruckeri* and *L. anguillarum* *aroA* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) and *aroC* (2, 3-dihydroxybenzoic acid) genes will be amplified and DNA fragments mutated by overlap extension PCR will be cloned into a suicide plasmid (pDS132). This plasmid will be transferred to *L. anguillarum* and *Y. ruckeri* for replacing wild type genes with mutated *aroA* and *aroC* genes via homologous recombination. Successful completion of this phase is expected to yield live attenuated vaccine candidates.
2. **Determination of virulence and efficacy of mutated *Y. ruckeri* and *L. anguillarum*:** Virulence of mutant *Y. ruckeri* and *L. anguillarum* will be determined by infecting juvenile rainbow trout with mutant bacteria and calculating fish mortalities and immune responses in fish. Similarly, efficacy of mutant *Y. ruckeri* and *L. anguillarum* will be determined by vaccinating fish with mutant bacteria and then challenging the same fish with wild type *Y. ruckeri* RB0708 and *L. anguillarum* LMG10861 1, 3, 6, 9, 12 months after vaccination.

It is expected that these live attenuated vaccines will provide resistance against the wild type *Y. ruckeri* and *L. anguillarum* infections in trout, and thus, prevent onset and progress of diseases. Successful completion of this study is expected to prevent fish losses due to *Y. ruckeri* and *L. anguillarum* infections and increase the profitability of aquaculture. Contend with fish diseases using traditional methods is generally ineffective and expensive. For example, formation of antibiotic resistance in bacteria against antibiotics, and chemical contamination of environment are some of the undesirable outcomes. For these reasons, prevention of fish diseases using vaccination strategies is important for ensuring the profitability and sustainability of aquaculture production. It is our expectation that this project will contribute to development of aquaculture in Turkey and lead to domestic vaccine production efforts.

Orman Çalışma Alanı Örneği :

Nanocomposites are new kind of composite materials and at least one dimension of reinforced material used in polymer matrix has to be smaller than 100 nanometers. Up to date nano inorganic materials such as clay, silica and TiO₂ mostly used as reinforced materials in the studies performed in nanocomposites field. Even though various inorganic nanofillers were used in nanocomposites, renewable and environmental friendly natural reinforced materials became the subject of research in the recent years. Within the last decade there was usage and significant increase on the research of the organic reinforced materials obtained from bio-based renewable resource. Cellulose whiskers obtained from the lignocellulosic resources, various sea animals (tunicin, chitin) and bacterial cellulose were the most important reinforced material between natural nanofillers. It is necessary that reinforced materials should show good dispersion in matrix.

The main aim of this project is the production of cellulose whiskers reinforced polymer nanocomposites. Cellulose whiskers will be produced from MCC cellulose by acid hydrolysis for production of nanocomposites. Cellulose whiskers will also be characterised with AFM, X-ray, ¹³C CP-MAS, NMR and FTIR analysis. The main limitation usage of cellulose whiskers in thermoplastic polymer matrix is hydrophilic characters of whiskers. For this hydrophilic character, whiskers cannot show homogen mixture between matrix and cause compatibilization problems. For this reason before nanocomposites production it is necessary to change the nature of cellulose whiskers by chemical modification. Chemical modification will be performed with four anhydrides (acetic, butyric, stearic and decanoic anhydrides) and four vinyl esters (vinyl acetate, vinyl butyrate, vinyl stearate and vinyl decanoate). Our aim is the production of nanocomposites from chemically modified cellulose whiskers without detrimental effect on the crystals behaviour of whiskers. High density polyethylene (HDPE) will be used as polymer matrix in nanocomposites because melting points is around 120-130°C lower than the degree of cellulose degradation. There has been no research done by now regarding the production of nanocomposites reinforced with cellulose nanowhiskers in Turkey. This research project will be the first study on the nanotechnology area in the forest products field in our country.

Keywords:

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF), cell-culture based inactivated vaccine, CCHFV NP and Gn spesifik T cell immunodominant regions, vaccine-induced cellular and humoral immunity.

Aromatic amino acid biosynthesis network (*aro*), *aroA*, *aroC*, *aroB*, *aroD*, *aroE*, overlap PCR, live attenuated vaccine, *Yersinia ruckeri*, *Listonella anguillaru*

Nanocomposites, cellulose whiskers, chemical modification, transesterification, thermoplastic

2. AMAÇ VE HEDEFLER

Projenin amacı ve hedefleri ayrı bölümler halinde kısa ve net cümlelerle ortaya konulmalıdır. Amaç ve hedeflerin belirgin, ölçülebilir, gerçekçi ve proje süresinde ulaşılabilir nitelikte olmasına dikkat edilmelidir.

Veteriner Çalışma Alanı Örneği:

İnsanlarda şiddetli kanama ve toksik belirtilerle seyreden Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı (KKKAH) Bunyaviridae ailesinin Nairovirüs genusunda yer alan bir RNA virüs tarafından oluşturulmaktadır. Hastalık Asya, Afrika, Ortadoğu ve Doğu Avrupa'yı içerisine alan geniş bir coğrafyada görülmekte ve mortalitesi %5-50 arasında değişmektedir. Ülkemizde ilk klinik vakalar 2002 yılında görülmüş olup, takip eden yıllar artan vaka ve ölüm sayılarıyla devam etmiştir.

Hastalığın spesifik bir tedavisi yoktur. KKKAH'a karşı Bulgaristan'da 1970'li yıllarda fare beyni kullanılarak hazırlanan "Bulgar Aşısı" aşısı dışında bir aşı yoktur. Bununla beraber, "Bulgar Aşısı" Bulgaristan dışında hiçbir ülkede ruhsatlanmamış olup güvenilirliği ve potensi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır.

Ülkemizde, son 10 yıldır bildirilen ve dünyanın en büyük KKKAH salgınları şeklinde seyreden hastalık en önemli sağlık problemlerinden biri olarak değerlendirilmektedir. Ülkemizde konuyla ilgili olarak bilimsel çalışmalar yapılmakta ve ilgili birimler çeşitli stratejiler geliştirerek hastalıkla mücadele etmektedirler. Bu stratejiler arasında; koruyucu aşı geliştirilmesi, hızlı ve duyarlı teşhis metodlarının standardize edilmesi, endemik bölgelerdeki insanların ve ilgili sağlık personelin eğitimi, risk analizleri, koordinasyon, sosyal mobilizasyon, hastalığın epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalar, vektör kontrolü vb. sayılabilir. Bu bağlamda, T.C. Sağlık Bakanlığı'nın müşteri kurum olduğu Fırat ve Kafkas Üniversitelerinin yürütücü olduğu "Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Epidemiyolojisi, Moleküler Karakterizasyonu, Antijen ELISA Geliştirilmesi ve Koruyucu Aşı Çalışmaları" isimli ve 108G126 nolu TÜBİTAK KAMAG projesi 2010 yılında yürürlüğe girmiş olup 2014 yılında bitirilmesi ön görülmektedir. Projenin en önemli ayaklarından birisi olan aşı geliştirilmesi ilgili olarak önemli gelişmeler sağlanmıştır. Hastalığa karşı, KKKAH Kelkit06 suşu kullanılarak hücre kültür tabanlı inaktif aşı geliştirilmiş ve klinik öncesi (preklinik) çalışmalarının birçoğu tamamlanmıştır. Balb/c farelerinde yüksek düzeyde IgG ve nötralizan antikor oluşumu belirlenmiştir. İnterferon alfa/beta genleri çıkarılmış IFNAR farelerde (knockout fareler) yapılan epruvasyon çalışmalarında %80 oranında koruma sağlanmıştır. Bununla beraber, geliştirilen hücre kültür tabanlı inaktif aşıya karşı klinik öncesi fazda hücresel immün yanıtın araştırılması proje kapsamında bulunmamaktadır. Önerilen bu araştırma projesi ile, 108G126 nolu TÜBİTAK KAMAG projesi kapsamında KKKAH karşı geliştirilen hücre kültür tabanlı inaktif aşıya bağlı oluşacak hücresel immün yanıt araştırılacaktır.

Önerilen bu araştırma projesinde temel 2 amaç öngörülmektedir.

1- KKKAH'a karşı geliştirilmiş hücre kültür tabanlı inaktif aşıya bağlı hücresel immün yanıtın belirlenmesi için T hücrelerini aktive eden KKKAH Kelkit-06 suşu NP ve Gn spesifik immunodominant bölgelerin identifiye edilmesi. Bu amaçla, KKKAH Kelkit06 suşunun tam büyüklükteki NP ile Gn glikoproteinini içeren sentetik peptidler kullanılacaktır.

2- Farklı dozlarda hazırlanarak Balb/c farelerine verilecek olan KKKAH inaktif aşısına karşı oluşacak hücresel immün yanıtın IFN- γ ELISPOT, akış sitometrisi ve sitokin ELISA testleri ile değerlendirilmesi. Ayrıca, indirekt ELISA ve pseudo-plak redüksiyon nötralizasyon testi (PPRNT) ile aşıya bağlı humoral immün yanıtın araştırılması ile KKKAH aşısı tarafından oluşturulan hem hücresel hem de humoral yanıtın belirlenmesi.

Orman Çalışma Alanı Örneği:

Fidan üretiminde Anadolu karaçamı [Pinus nigra Arnold subsp. pallasiana (Lamb.) Holmboe], ibrelî ağaç türlerimiz arasında geçmişten beri kızılçam ve sedirden sonra üçüncü sırada yer alan orman ağacıdır. Günümüzde ise karaçam, sedir ile birlikte fidanı en çok üretilen türdür. Yarı kurak alan ağaçlandırmalarında en yaygın olarak kullanılan ağaç türü Anadolu karaçamıdır ve bu türümüz doğal yayılış itibarıyla stepe en fazla sokulan ibrelî ağaçlarımızdan en önemlisidir. Ancak bu türün ülkemizde yapay aşılama yöntemiyle mikorizalı fidan üretimi konusunda yapılmış bilimsel bir çalışma bulunmamaktadır. Bahsi geçen mikorizal mantarlar kökün su ve besin maddesi alım kapasitesini artırırken, aynı zamanda toprakta ağ gibi gelişmesiyle toprağın taşınmasını engeller. Ayrıca bu mantarlar bitkileri aşırı sıcak ve soğuk gibi abiyotik etkenlerin yanında hastalık yapan biyotik etmenlere karşı da korumaktadır.

Üretilen karaçam fidanlarının çoğunluğu ülkemizin yarı kurak ve uzun süreli dönemsel kuraklığa sahip iklim özelliği taşıyan; Akdeniz ardı, İç Ege, Karadeniz ardı, İç ve Doğu Anadolu bölgelerinde kullanılmaktadır. Genel itibarı ile ülkemizin üçte birinden fazlasının kurak ve yarı kurak özellik taşıdığı göz önünde bulundurulduğunda bu sahalarda yapılacak çalışmaların önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Bu bölgelerde ağaçlandırılması düşünülen sahalarda antropojenik etkiler nedeniyle; ekolojik denge bozulmuş, topraktaki canlı etkinlik gerilemiş ve bu sahalar günümüzde bozkır (step) ekosisteminin bitkileriyle kaplanmıştır.



Buralarda yapılacak ağaçlandırma ve erozyon kontrolü çalışmalarında toprağın mikrobiyolojik etkinliğinin iyileştirilmesi, çalışmaların başarısı açısından oldukça önemlidir. Bu nitelikteki sahalarda mikorizalı fidan kullanımı topraktaki biyolojik etkinliğin hızla artmasını sağlayarak ağaçlandırmalarda daha yüksek başarıya ulaşılmasına yol açacaktır.

Ülkemizde karaçamın fidanlık pratiğinde mikorizalı fidan üretimi henüz bilimsel bir ortamda denenmemiştir. Ayrıca yarı kurak alanlarda var olan doğal mikorizal mantar türlerimiz üzerinde de henüz bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile, Akdeniz ardı, İç Ege ve İç Anadolu'nun güneyinde bulunan doğal mikorizal mantar türlerimizin tespiti, bu türlerimizden saf kültüre alınabilenlerin laboratuvar ortamında üretilmesi ve elde edilecek kültürlerin çoğaltılarak karaçam fidanlarına aşılınması yoluyla mikorizalı fidan üretimi amaçlanmaktadır. Böylece karaçam ile ortak yaşam kuran yerel mikorizal mantar türlerimizin karaçam fidanlarının morfolojik ve fizyolojik özellikleri üzerine etkileri tespit edilmiş olacaktır.

3. KONU, KAPSAM ve LİTERATÜR ÖZETİ

Proje önerisinde ele alınan konunun kapsamı ve sınırları, projenin araştırma sorusu veya problemi açık bir şekilde ortaya konulmalı ve ilgili bilim/teknoloji alan(lar)ındaki literatür taraması ve değerlendirilmesi yapılarak proje konusunun literatürdeki önemi, arka planı, bugün gelinen durum, yaşanan sorunlar, eksiklikler, doldurulması gereken boşluklar vb. hususlar açık ve net bir şekilde ortaya konulmalıdır.

Literatür değerlendirmesi yapılırken ham bir literatür listesi değil, ilgili literatürün özet halinde bir analizi sunulmalıdır. Referanslar <http://www.tubitak.gov.tr/ardeb-kaynakca> sayfasındaki açıklamalara uygun olarak EK-1'de verilmelidir.

Gıda Çalışma Alanı Örneği:

Günümüzde fermentasyonla enzim üretimi konusunda gerçekleştirilen araştırmalarda temel amaç, üretim şartlarının optimize edilerek mümkün olan en düşük maliyetle en yüksek faydayı sağlayacak saflıkta enzim üretmektir. Bu nedenle bu proseslerde saf kimyasalların yanısıra yenilenebilir doğal kaynakların kullanımı da son yıllarda önem kazanmıştır. İlaç, kimya, tekstil ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaya başlayan ve ilerleyen yıllarda daha değerli bir duruma gelecek olan mannanaz enziminin saf kimyasallar ve doğal kaynaklar kullanılarak üretimi, yabancı kaynaklı araştırmacılar ve ticari firmalar tarafından yeni teknolojiler ve saflaştırma teknikleri geliştirilerek patent altına alınmaktadır. Benzer şekilde ülkemizde de enzim üreten birçok mikroorganizmanın farklı ortamlardan izolasyonu, karakterizasyonu ve üretimi ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca doğal olarak bu enzimleri üreten mikroorganizmaların genleri tespit edilerek daha yüksek miktarda enzim üretme kapasitesine sahip rekombinant mikroorganizmaların üretimi ile ilgili çalışmalara da hız verilmiştir. Bu amaçla mannanaz enzimini doğal olarak üreten bir patojen olan ve ürettiği enzim, toksik etkisinden dolayı gıda endüstrisinde kullanılamayan *Aspergillus fumigatus* (IMI 385708)'dan mannanaz geninin proteinini kodlayan bölgesi izole edilmiştir. İzole edilen gen toksin üretmediği için GRAS (Generally Recognized As Safe) listesinde yer alan *Aspergillus sojae*'ye transfer edilerek yüksek seviyede mannanaz üreten Rekombinant *Aspergillus sojae* (ATCC 11906) geliştirilmiş (Duruksu vd. 2009) ve enzim üretim şartlarının optimize edilmesi üzerine küçük ölçekli flask denemeleri gerçekleştirilmiştir (Ozturk vd. 2010). Bunun yanında önerilen projenin yürütücüsü tarafından yürütülen ve söz konusu Rekombinant *Aspergillus sojae* kullanılarak keçiyoynuzu ekstraktının mannanaz üretiminde potansiyel substrat olarak kullanımını amaçlayan bir projede flask denemeleri gerçekleştirilmiş ve hemen hemen sonuç aşamasına gelinmiştir. Sonuç aşamasına geline bu projeden elde edilen verilerden mannanaz üretiminin farklı yöntem ve tekniklerle daha da artırılabilirliği ve optimize edilebileceği, enzimin farklı yöntemlerle saflaştırılması, muhafazası ve gıda endüstrisinde kullanımına yönelik deneysel yöntemleri içeren bir proje hazırlanmasına karar verilmiştir.

Mannanaz enziminin saflaştırılmasında affinasyon kromatografisi ve iyon değişirme tekniklerinin kullanılması, ülkemiz dışında yapılmış çalışmalar sonucunda patent altına alınmıştır. Bu teknikler son derece pahalı yöntemleri kapsadığı için, dünya piyasasında mannanaz enzim preparatlarının çok yüksek fiyatla satıldığı görülmektedir. Örneğin; üretildiği karbon kaynağı itibarıyla fermentasyonda kullanılan saf şekerler veya doğal kaynakların kilogram fiyatı 4-5 TL'yi geçmezken, bunlardan üretilen mannanaz enziminin gram fiyatı 1000 dolar olarak karşımıza çıkmaktadır. Görüldüğü gibi ekonomik değeri pek fazla olmayan organik materyaller kullanılarak katma değeri yüksek bir ürünün üretilmesi söz konusudur. Ülkemizde mikroorganizma izolasyonu, karakterizasyonu, yeni rekombinant mikroorganizma üretimi, üretim şartlarının optimizasyonu, ürünlerin ayrılması, saflaştırma yöntemleri ve elde edilen enzimin uygulama alanında denenmesi üzerine birbirinden bağımsız çalışmalar yapılmaktadır. Ancak, gıda endüstrisinde örnek birkaç uygulamayı da içeren, üretilen enzim miktarının farklı fermentasyon ve immobilizasyon teknikleriyle artırılmasını, daha ucuz ve kolay saflaştırma yöntemlerinin (değiştirme ve kromatografik yöntemlere göre) kullanılmasını ve elde edilen enzimin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile birlikte çalışma şartlarının da belirlenmesini amaçlayan ve gıdalar üzerine örnek bir denemeyi içeren kapsamlı bir çalışmanın bulunmadığı görülmüştür.

Bu çalışmada öncelikle; farklı karbon kaynakları kullanılarak yarı kesikli beslemeli (fed-batch) fermentasyon ile mannanaz üretimleri gerçekleştirilecektir. Küçük ölçekli kesikli kültürde gerçekleştirilen yöntemler yerine bu projede, ölçek büyütülerek fermentörde yarı-kesikli beslemeli uygun fermentasyon stratejileri geliştirilecektir. Bu amaçla yarı kesikli beslemeli fermentasyonlarda rekombinant *Aspergillus sojae*; süspansiyon halde, mikropartiküllerle birlikte, Ca-Alginat ile hapsedilerek ve reaktör içerisinde uygun materyaller üzerinde (plastik kompozit materyal, PKD) biyofilm oluşturmak üzere 4 farklı şekilde kullanılacaktır. Fermentasyon işlemi sonrasında üretilen mannanaz enziminin saflaştırılması amacıyla sırasıyla flokülasyon, santrifüjleme ve ultrafiltrasyon (UF) işlemleri uygulanacaktır. Uygulanan işlemlerin etkisiyle aktivitesi artırılan sıvı enzim preparatı, farklı tampon çözeltilerde sıvı olarak ve dondurarak kurutma neticesinde de liofilize formunda elde edilecektir. Tüm fermentasyon işlemleri sonunda enzim aktivitesi, şeker içeriği, biyokütle miktarı ve hücre morfolojisi analizleri, saflaştırma işlemlerinden sonra ise SDS-PAGE ile kütle tespiti ve boyama ile glikolizasyon (glyco staining) analizleri gerçekleştirilecektir.

Bunun yanında enziminin optimum çalışma sıcaklığı ve pH'sı da belirlenerek farklı gıdalar üzerine uygulamaları gerçekleştirilecektir. Bu amaçla galaktomannan içeren keçiyoynuzu ve guar gamlarında, nişastada ve selülozda hidroliz denemeleri gerçekleştirilerek elde edilen mannanaz enziminin etkinliği belirlenecektir. Ayrıca mannanazın gıda endüstrisinde maserasyon işleminde de kullanılabildiği bilinmektedir. Bu nedenle meyve konsantresi üretiminde keçiyoynuzu ekstraktı eldesinde klasik yöntemlerle sıcak su ile ekstrakte edilen keçiyoynuzu meyvesi, mannanaz enzimi ile maserasyona tabi tutularak ekstraksiyonun üzerine olumlu etkilerinin olup olmadığı deneysel olarak belirlenecektir. Ayrıca gıdalar üzerinde yapılan denemelerde ticari enzim preparatları da kullanılarak fermentasyon ile üretilen mannanazla aralarındaki fark belirlenecektir. Son olarak da projede üretilen mannanazın üretim maliyeti hesaplanacaktır. Ancak unutulmamalıdır ki; proje kapsamında mannanaz enziminin farklı fermentasyon teknikleriyle yüksek aktivitede elde edilmesinde ve saflaştırılmasında kullanılan bazı kimyasalların gıda maddesi olarak tüketilmesi uygun değildir. Bu nedenle elde edilen enzimin gıda endüstrisinde kullanımına deneysel olarak yer verilmiştir. Kuşkusuz sonuçların olumlu çıkması durumunda daha başka projelerle insan sağlığı açısından sakıncası olmayan (food grade) proseslerin geliştirilmesi ile bu sorunun ortadan kalkacağı düşünülmektedir.

Özetle projede; farklı fermentasyon teknikleri kullanılarak Rekombinant *Aspergillus sojae* ile üretilen mannanaz miktarının artırılması, fermentasyon sonrasında basit saflaştırma yöntemleri kullanılarak uygulanan her basamakta daha yüksek aktivitede enzim elde edilmesi, elde edilen enzimin özellikleri ve çalışma şartlarının belirlenmesi, uygun yöntemlerle muhafazası (farklı tampon çözeltiler ve liofilize enzim) ve farklı gıdalara uygulanarak substrat spesifikliğinin ve endüstride kullanım etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Dünya'da yeterince değerlendirilemeyen birçok tarımsal ürün, gıda işleyen fabrikaların atıkları ve yüksek basit şekerler ve polisakkarit içeren diğer atıklar fermentasyon yoluyla yeni ve katma değerli ürün üretiminde kullanılmaktadır. Bu amaçla birçok enzim, organik asit, vitamin, amino asit, alkol, antibiyotik ve antibodi gibi ekonomik değeri yüksek ürünler fermentasyon yoluyla üretilmektedir. Bu ürünlerin üretiminde yüksek saflıkta kimyasallar kullanıldığı gibi içeriği uygun tarımsal ürünler veya atıklar da kullanılmaktadır. Saf kimyasallarla üretimin çok pahalı olması ve ayrıca tarımsal ürünlerin organik atıklarının değerlendirilmesi gibi ekonomik ve çevreci yaklaşımlar, alternatif olarak doğal yetişen ürünleri hammadde olarak kullanmaya olan ilgiyi artırmıştır. Bu alanda şeker pancarı, melas, şeker kamışı, keçiyoynuzu ekstraktı ve mısır gibi birçok bitkisel ürün yaygın olarak kullanılmaktadır. Fermentasyon yoluyla elde edilen mikrobiyal mannanaz gıda, yem ve deterjan endüstrisinde son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların genetik olarak değiştirilebilmesindeki gelişmelerle yeni ve istenilen ürünleri üretebilme yeteneğine sahip mannanaz üretiminin imkânlarında gelişme sağlanmıştır. Toplu üretimi daha kolay olduğundan, ekstraselüler mannanaz önemli bir ticari değere sahiptir. Mannanaz genellikle gıdaların vizkozitesinin azaltılması, meyve suyu üretiminde berraklaştırma ve maserasyon işlemlerinde, yem sanayi, kağıt ve pulp endüstrilerinde ağaç hamurunun enzimatik ağartılmasında, instant kahve üretilmesinde, deterjan ve tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu amaçla çalışmada öncelikle; farklı karbon kaynakları kullanılarak yarı kesikli beslemeli (fed-batch) fermentasyon ile mannanaz üretimleri gerçekleştirilecektir. Daha önce hem Oztürk vd. 2010 hem de sunulan projenin yürütücüsü tarafından gerçekleştirilen küçük ölçekli kesikli kültürde flask denemelerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ancak özellikle de kullanılan küf göz önüne alındığında bir süre sonra fermentasyon ortamında oluşan kuvvetli miseller ve erlenmayer kenarlarında oluşan büyük pelletler nedeniyle substratın etkin olarak kullanılamaması ve neticesinde de düşük ürün miktarı ve verimi ile uzun fermentasyon süresi gibi problemler görülmektedir (Şekil 1). Bu nedenle daha önce küçük ölçekli kesikli kültürde gerçekleştirilen yöntemler yerine bu projede, üretilen enzim miktarını, fermentasyon verimini ve üretim hızını artırdığı bilinen ve bunun yanında fermentasyon süresini de kısaltacak immobilizasyon tekniklerini içeren uygun fermentasyon stratejileri geliştirilip ölçek büyütülerek fermentörde yarı kesikli beslemeli denemeler yapılacaktır.

Şekil 1. Flask denemelerinde erlenmayer duvarına yapışmış pellet görüntüsü

Bu projede gerçekleştirilecek olan fermentasyon denemelerinde saf kimyasallar, doğal kaynaklar veya atıkların karbon kaynağı olarak kullanılması öngörülmüştür. Ancak projede karbon kaynağı olarak kullanılacak materyalin mannanaz üretimine uygunluğunun ön denemeler gerçekleştirilerek belirlenmesi nin proje konusu olan fermentasyon denemelerinde oluşacak iş yükünün azaltılmasında faydalı olacağı düşünülmüş ve bu amaçla proje ekibi tarafından bazı ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Ön denemelerde sakaroz, glikoz, melas ve keçiyoynuzu ekstraktı kullanılarak ayrı ayrı kesikli flask denemeleri gerçekleştirilmiştir. Fermentasyondan elde edilen sonuçlara göre, en yüksek enzim aktivitesinin saf kimyasal olarak glikoz (453.73 U/ml) ve doğal kaynak olarak da keçiyoynuzu ekstraktından (386.23 U/ml) elde edildiği belirlenmiştir. Bunun yanında fermentasyon süresinin uzunluğu nedeniyle önerilen proje süresinin yeterli olmayacağı hesa plandığından diğer iki kaynağın (sakaroz (413.11 U/ml) ve melas (350.17 U/ml)) kullanımının mümkün olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak proje önerisinde doğal kaynaklar ve saf kimyasal kullanılarak üretilen mannanaz enzimlerinin karşılaştırılması da amaçlandığından, karbon kaynağı olarak glikoz ve keçiyoynuzu ekstraktının kullanılmasına karar verilmiştir.

Projede glikoz ve keçiyoynuzu ekstraktı, süspansiyon haldeki rekombinant *Aspergillus sojae* ile ayrı ayrı yarı kesikli beslemeli fermentasyona bırakılacaktır. Daha sonra, yeni bir yaklaşım olarak hem hücre gelişim morfolojisi açısından olumlu etkileri bildirilen hem de enzim üretim miktarını kesikli fermentasyona göre 4-10 kat artırdığı bilinen magnezyum silikat (3 MgO-4-SiO₂, 6 µm, talk pudrası), alüminyum oksit (Al₂O₃ Alcoa A-305) ve titanyum silikat oksit (TiSiO₄) gibi mikropartiküller yarı kesikli beslemeli fermentasyon ortamına eklenecektir. Bu amaçla 3 farklı mikropartikül farklı oranlarda, ayrı ayrı fermentasyonlarda ortama lag fazında eklenecektir. Alüminyum oksit (5, 10, 15 g/l) 100 mM sitrat tamponunda (pH:6.5) (Kaup vd. 2007), magnezyum silikat (1, 5, 10 g/L) 50 mM Na-asetat tamponunda (pH:6.5) (Driouch vd. 2010) ve titanyum silikat oksit (25 g/L) 50 mM Na-asetat tamponunda (pH 6.5) (Driouch vd. 2012) hazırlanarak 121°C'de 20 dakika sterilize edildikten sonra fermentasyon ortamına eklenecektir. Mikropartiküllerin fermentasyon ortamında kullanılmasına ek olarak hücreler



%2.5'luk Ca-Alginat ile immobilize edilerek fermentasyona bırakılacaktır. Ayrıca reaktör içerisinde farklı plastik kompozit destek materyalleri (PKD) üzerinde biyofilm oluşturularak fermentasyon denemeleri gerçekleştirilecektir. Fermentasyon ortamında mikroorganizmanın gelişme ve substratı tüketme etkinliği göz önüne alınarak yarı kesikli beslemeli fermentasyondaki besleme hızları da gerektiğinde değiştirilecektir.

Fermentasyon işlemi sonrasında üretilen mannanaz enziminin saflaştırılarak enzim aktivitesinin artırılması amacıyla fermentasyon ortamına 3 farklı flokülasyon ajanı (kitosan, amonyum sülfat, Polialüminyum klorit-Poliakrilamid (PAC-PAM)) eklenerek flokların oluşması sağlanacaktır. Bu şekilde flokların bir sonraki aşamadaki santrifüj yoluyla daha kolay ayrılması gerçekleşmiş olacaktır. Flokülasyonun etkinliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılan farklı flokülantlar, miktarları ve uygulama koşulları Cevap Yüzey Metodu ile optimize edilecektir. Santrifüj sonrasında mannanaz enzimi içeren berrak kısım 50 kDa, 30 kDa ve 10 kDa ayırma sınırına sahip membranlardan sırasıyla geçirilerek ultrafiltre edilecek ve böylelikle enzimin daha ileri düzeylerde saflaştırılması sağlanacaktır. Ayrıca santrifüj ve ultrafiltrasyon işleminden sonra elde edilen enzim içeren sıvı preperatın, farklı pH'lardaki tampon çözeltilerinde depolama stabilitesi ile farklı sıcaklık ve pH'lardaki enzim aktivitesi test edilecektir. Bunların yanında enzim içeren sıvı preperat farklı stabilizatörler kullanılarak dondurarak kurutucuda kurutulacaktır.

Fermentasyon işlemi sonrasında enzim aktivitesi, şeker içeriği, biyokütle miktarı ve hücre morfolojisi analizleri, saflaştırma işlemlerinden sonra ise, SDS-PAGE ile kütle tespiti, enzim aktivitesi ve boyama ile glikolizasyon (glyco staining) analizleri gerçekleştirilecektir. Elde edilen mannanaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı ve pH'sı belirlendikten sonra gıda endüstrisinin farklı alanlarında kullanılmak üzere deneysel uygulamalar gerçekleştirilecektir. Bu amaçla galaktomannan içeren keçiyoynuzu ve guar gamırlarında, nişasta ve selülozda hidroliz denemeleri gerçekleştirilerek enzim etkinliği belirlenecektir. Ayrıca mannanaz enzimlerinin gıda endüstrisinde maserasyon işleminde kullanılabileceği düşünülmektedir. Meyve suyu üretiminde klasik yöntemlerle sıcak su ile ekstrakte edilen keçiyoynuzu meyvesi, mannanaz enzimi ile maserasyona tabi tutularak ekstraksiyonun etkinliği belirlenecektir. Bu amaçla meyve suyuna geçen toplam şeker ve fenolik bileşiklerin analizi yapılacaktır. Buna ilaveten iki farklı karon kaynağından fermentasyon yoluyla elde edilen mannanaz enziminin etkinliğinin karşılaştırılması amacıyla ticari olarak da satın alınacak mannanaz enzimi gıdalara uygulama aşamasında projede kullanılacaktır. Ayrıca tüm üretim aşamaları göz önünde tutularak mannanaz üretim maliyeti de projede hesaplanacaktır. Proje kapsamında daha önce de belirtildiği gibi karbon kaynağı olarak glikoz gibi saf kimyasalın yanında doğal ve zengin şeker içeriğine sahip keçiyoynuzu ekstraktının ön denemeler sonucunda kullanılmasına karar verilmiştir. Buradaki amaç saf kimyasallar kullanılarak üretilen enzim ile daha kompleks kaynaklardan üretilen enzimin miktarı ve özellikleri bakımından farklılıkların olup olmadığının da belirlenebilmesidir.

Yukarıda sonuçları paylaşılan ön denemeler projenin birinci hedefi olan farklı fermentasyon yöntemleri uygulanarak en yüksek seviyede enzim aktivitesine ulaşmak ve elde edilen enzimin saflaştırılması üzerine klasik kromatografik yöntemlerin aksine daha kolay uygulanabilir işlem basamaklarını içeren fiziksel metotlarla zenginleştirilebilecek sürekli bir prosesin oluşturulabileceğini işaret etmektedir.

Veteriner Çalışma Alanı Örneği:

Proje önerisinin konusu, KKKAH'a karşı geliştirilmiş hücre kültür tabanlı inaktif aşıya bağlı oluşacak olan hücresel immun yanıtın belirlenmesinde gerekli olan ve T hücrelerini spesifik olarak aktive eden KKKAH Kelkit-06 suşu NP ve Gn spesifik immunodominant bölgelerin identifiye edilmesi ve KKKAH'a karşı geliştirilmiş hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile immunize edilen Balb/c farelerinde hücresel ve humoral immun yanıtın araştırılmasıdır.

Proje önerisi kapsamında yapılacak olan faaliyetler;

- 1- KKKAH Kelkit06 suşunun tam büyüklükteki nükleoproteini (NP) ile glikoprotein Gn'i içeren peptidlerin sentezi,
- 2- KKKAH inaktif aşı hazırlanması (KKKAH Kelkit06 suşunun Vero E-6 hücrelerinde üretilmesi, konsantre edilmesi, sükröz gradient ultrasantrifüj sistemi ile pürifiye edilmesi, inaktive edilmesi, filtrasyon, antijen miktarının belirlenmesi ve adjuvanize edilmesi),
- 3- Balb/c farelerinin KKKAH inaktif aşı ile immunize edilmesi,
- 4- Son immunizasyondan 15 gün sonra immunize edilmiş ve kontrol Balb/c farelerinin dalak hücrelerinin KKKAH Kelkit-06 suşu NP ve Gn spesifik sentetik peptit havuzları ile stimüle edilmesi,
- 5- Enzime Bağlı İmmunosorbent Spot (ELISPOT) testi ile IFN-gama üretiminin gösterilmesi ve hangi peptit havuzlarının spesifik olarak T hücrelerini aktive ettiğinin belirlenmesi,
- 6- KKKAH Kelkit-06 suşu NP ve Gn için immunodominant olduğu belirlenen ve her biri için (NP ve Gn) ortalama 5 adet toplam 10 adet sentetik peptit havuzlarının seçilmesi,
- 7- Seçilen peptit havuzlarını (her bir peptit havuzu 10 peptit içerecek) oluşturan her bir peptidin NP ve Gn için immunodominant olup olmadığının belirlenmesi ve böylece T hücrelerini tek bir peptit düzeyinde spesifik olarak aktive eden immunodominant bölgelerin identifiye edilmesi,
- 8- Aşı doz grupları ve kontrol gruplarının oluşturulması ve KKKAH inaktif aşı ile immunize edilmesi,
- 9- Belirli aralıklarla deney hayvanlarından kan serumu alınarak KKKAH anti-IgG ve nötralizan antikor düzeyinin belirlenmesi,
- 10- Son immunizasyondan 15 gün sonra, immunize edilmiş ve kontrol Balb/c farelerinin dalak hücrelerinin kültüre edilmesi ve NP ve Gn spesifik sentetik peptitlerle ile stimüle edilerek ELISPOT testi ile IFN-gama yanıtının araştırılması,
- 11- Akım Sitometrisi (Flow Cytometer) ile CD3, CD4, CD8 ve IFN-gama düzeylerinin ikili boyama ile gösterilmesi ve hangi T hücrelerinin IFN-gama üretimini hangi düzeyde gerçekleştirdiklerinin saptanması,
- 12- Kültür üst sıvısı kullanılarak IFN-gama, TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-5 ve IL-10 düzeylerinin belirlenmesi.

2006 yılında çalışma grubumuz tarafından izole edilen ve hücre kültür tabanlı inaktif KKKAH aşısının geliştirilmesinde kullanılan



KKKAH Kelkit06 suşu genetik düzeyde karakterize edilmiş bir suştur (Özdarendeli ve ark., 2010). KKKAH Kelkit06 suşu, ülkemizde yaygın olarak sirküle olan prototip bir KKKAH virüsüdür. Bu bağlamda, T hücrelerini spesifik olarak aktive eden immunodominant bölgelerin identifiye edilmesi için kullanılacak NP ve Gn spesifik peptit havuzları KKKAH Kelkit06 suşunun NP ve Gn amino asit dizilemlerine göre sentezlenecektir. Proje önerisi kapsamında sentez edilecek peptitler KKKAH Kelkit06 suşunun 2 major proteinini içermektedir. Bunlar tam büyüklükteki NP 482 aminoasit, Gn 284 aminoasit den oluşmaktadır. Son yıllarda biyoinformatik software ve bilgisayar programlarıyla, ilgili proteini oluşturan aminoasitlerin özellikleri baz alınarak tahmini antijenite, epitop temelli immunolojik bilgilerin elde edilmesi, ya da tahmini olarak immunodominant bölgelerin belirlenmesi mümkün olmaktadır. Bununla beraber tahmini olarak biyoinformatik software ve bilgisayar programları yardımıyla elde edilen verilerin doğruluk oranları değişim göstermektedir. Bu nedenle proje kapsamında tahmini immunodominant bölgelere ait peptid seçimi yapılmamıştır. Her ne kadar daha fazla iş gücü ve zaman alacak olsa da yukarıda detaylı olarak belirtilen KKKAH virüsünün 2 major proteini için spesifik peptit sentezi proje kapsamına alınmıştır. Proje önerisi kapsamında hücrel immun yanıtın en önemli indikatörlerinden birisi olan ve T hücreleri tarafından salgılanan IFN-gama yanıtı ELISPOT deneyi ile belirlenecektir. CD3, CD4, CD8 ve IFN-gama düzeyleri akım sitometri ile araştırılacaktır. İnaktif KKKAH aşısına karşı spesifik olarak üretilen IFN-gama'nın hangi düzeyde yardımcı T hücreleri (CD4) ve sitotoksik T hücreleri (CD8) tarafından üretildiği belirlenecek ayrıca total T hücre (CD3) sayısı proje kapsamında araştırılacaktır. ELISA ile kültür üst sıvısı kullanılarak IFN-gama, TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-5 ve IL-10 sitokinlerinin düzeyleri belirlenecektir. İnaktif KKKAH aşısına karşı oluşan hücrel immun yanıtın Th1 ya da Th2 yollarından hangisini kullandığına cevap aramak için adı geçen sitokinler proje kapsamında araştırılacaktır. Ayrıca, koruyucu özellikte olan nötralizan antikor yanıtı da ortaya konacaktır. Böylece çalışmadan elde edilen veriler bütünsel olarak KKKAH'a karşı geliştirilen inaktif aşının immun sistemi hücrel ve humoral olarak hangi düzeyde uyardığı ortaya konacaktır.

Su Ürünleri Çalışma Alanı Örneği:

Su ürünleri yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen faktörlerin başında balık hastalıkları gelmektedir. Balıkçılığın ve balık yetiştiriciliğinin beklenen düzeyde gelişmesi, balıkların uygun koşullarda yetiştirilmesi ve hastalıklardan korunmasına bağlıdır. Hastalıklardan kaynaklanan olumsuzlukları engellemek amacıyla; Avrupa Birliği (AB) balık sağlığı kontrolü için gerekli yasal düzenlemeleri "AB Balık Sağlığı Rejimi" isim ve "91/67/EEC" numaralı yönetmelikle yürürlüğe koymuştur. Bu direktif kapsamında balık hastalıklarından arındırılmış kuşaklar oluşturulması için öncelikle mevcut hastalıklardan korunma sağlanmalıdır.

Ticari su ürünleri yetiştiriciliğinde bulaşıcı hastalıklara sebep olan patojenler, üzerinde durulması gereken en önemli problemler arasında gelmektedir. Salgın hastalıklar yetiştiricilikte büyük kayıplara sebep olabilmekte ve çoğu durumlarda, koruyucu ve tedavi edici önlemler alınamamaktadır (Leong ve Fryer, 1993; Mialhe vd., 1995).

Karadeniz Bölgesinde bulunan çiftliklerin %43'ünde hastalıklardan dolayı yavru balık ölümleri görülmektedir (Üstündağ vd., 2000). Balık çiftliklerinde gelişen güzel antibiyotik kullanımı patojenik bakterileri antibiyotiklere karşı daha dirençli hale getirmekte ve bu nedenle de çiftliklerde uygulanan antibiyotik tedavilerinin büyük bir çoğunluğu sonuçsuz kalmaktadır (Andersen ve Sanda, 1994; Cizman, 2003; Kayis vd., 2009). Örneğin, salmonidlerde furunkulosis hastalığına neden olan *Aeromonas salmonicida salmonicida* da tetrasiklinlere karşı oluşan direnç 1981 de %4 iken (Aoki vd., 1983) bu oran 1990'larda %50 ye ulaşmıştır (Richards vd., 1992). Kromozom üzerinde bulunan doğal antibiyotik dirençlilik geni dışında, bakterilerde antibiyotik dirençlilik genleri plazmid üzerinde de bulunmaktadır. Bu plazmitler kromozomlardan bağımsız olarak çoğalmakta ve bakteriler arasında plazmit alışverişi vasıtasıyla antibiyotiklere karşı oluşan direnç bakteriler arasında hızla yayılmaktadır (Peterson vd., 2002). Ayrıca antibiyotiğe dirençli bakterilerin plazmitlerindeki dirençlilik geni sucül ortamdaki bakterilerden insanları enfekte eden bakterilere geçmekte ve insan sağlığı açısından büyük riskler oluşturmaktadır (Sobecky vd., 1997). Bu bağlamda bakteriyel hastalıkları antibiyotiklerle tedavi etmek yerine bu hastalıklardan aşılarda korunmak hem iş gücünü azaltacak hem de masrafları düşürecektir.

Türkiye sularında bulunan alabalıklarda en fazla görülen yersiniyöz hastalığına sebep olan *Y. ruckeri*'dir (Kayis vd., 2009). *Y. ruckeri* balıkları hem tatlı suda hem de deniz suyunda enfekte edebilmektedir (Altınok ve Grizzle, 2001). *L. anguillarum* ise denizde yaşayan levrek, kalkan, salmonidler gibi birçok balık türünde hastalık yapabilmekte ve kültür yetiştiriciliğinde yüksek oranlarda ölümlere sebep olmaktadır (Plumb, 1999). Örneğin, Haziran 2009 tarihinde Trabzon ili Yomra ilçesindeki deniz kafeslerinde bulunan levreklerde ölümler olmuş ve balıkların %70'e yakınının *L. anguillarum*'un sebep olduğu vibriosiz hastalığından öldüğü belirlenmiştir (Vet. Hacı Savaş, kişisel görüşme). Ayrıca, ekibimiz tarafından tamamlanan DPT projesi kapsamında tatlı suda yaşayan balıklarda en fazla *Y. ruckeri* izole edilirken deniz suyunda yaşayan balıklarda da en fazla *L. anguillarum* izole edilmiştir (Kayis vd., 2009). Yersiniyöz ve vibriosiz hastalıklarından korunmak için Intervet firmasının AquaVac lisansı ile ürettiği *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* için geliştirdikleri inaktive edilmiş oral aşılarda "AquaVac ERM" ve "AquaVac Vibrio" adı altında ayrı ayrı satılmaktadır (Gould, 2003). Bu aşılarda 3-5'er gram ağırlığındaki balıkların 30 saniye süreyle immersiyon yoluyla 3 ila 6 ay koruma sağlamaktadır. Bütün üretim periyodu boyunca koruma sağlamak için ikinci defa aşının enjeksiyonla balıklara verilmesi gerekmektedir. Bu da zaman ve işgücü kaybı ile balıklarda da strese neden olmaktadır (Meeusen vd., 2007).

Yukarıda sayılan nedenlerden dolayı, bu projede hem tatlı su hem de deniz suyundaki su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli kayıplara neden olan yersiniyöz ve vibriosiz hastalıklarına karşı daha etkili koruma sağlamak için canlı atenüe aşılarda geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Bakteriyel hastalıkları antibiyotiklerle tedavi etmek yerine bu hastalıklardan korunmak için balıkları aşılarda en iyi yöntemlerden birisidir. Bu bağlamda aşılarda klasik yöntemlerle elde edilen (canlı atenüe aşılarda ve inaktif (ölü) aşılarda) ve moleküler tekniklerle hazırlanan (rekombinant DNA aşılarda, mutant aşılarda, anti-idiotip antikor aşılarda ve kimyasal yolla sentez edilen sentetik aşılarda) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Klasik aşılarda mikroorganizmaların gövdelerinden veya organellerinden hazırlanan atenüe veya inaktif aşılardır. Atenüe aşılarda, yapay olarak virülansı azaltılmış mutant suşlar elde edilerek veya doğal olarak virülansı zayıf olan suşların seçimi ile hazırlanır. Yapay olarak virülansı azaltılmış mutant suşlar, besi yerlerinde, deney hayvanlarında, doku kültürlerinde ve embriyolu yumurtada uzun süre yapılan pasajlarla elde edilir (Robinson, vd., 2003). Bunların dezavantajları ise; latent ya da gizli seyir eden hastalıklar canlı aşı uygulaması ile tekrar aktif hale geçebilirler, latent enfeksiyonlu hayvanlarda



aşıdaki mikroorganizma miktarı fazla gelerek hastalık oluşturabilir, aşırıya bağlı aşılama sonrası zararlar meydana gelebilir, canlı aşı uygulanan hayvanlarda mikroorganizma genellikle çevreye yayılır ve buda civardaki aşısız hayvanlar için tehlike oluşturabilir (Meeusen vd., 2007).

Cansız inaktif aşılar, bakterilerin ısı, formaldehit, fenol, aseton, ultraviyole gibi çeşitli yöntemlerle öldürülerek inaktive hale getirilmesiyle elde edilir. Cansız aşılar çoğunlukla enjeksiyon yöntemiyle uygulanır (Robinson, vd., 2003). Günümüzde *A. salmonicida*, *E. ictaluri*, *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* için inaktif aşılar geliştirilmiştir (Gould, 2003). İnaktif aşılardan konakçının bağışıklık sistemini geliştirme güçleri atenué aşılardan daha azdır ve kısa süreli bağışıklık verirler. İnaktif aşılardan bağışıklık yeteneğini artırmak için uygun adjuvantlardan biri ile verilmesi gerekir. Antijenin bağışıklık gücünü artırmak aşının çift doz uygulanmasıyla verilmesi de mümkündür. Ancak ikinci enjeksiyon sonrası yabancı proteinlerin tekrar vücuda girmesinden doğacak aşırı duyarlılık gibi alerjik reaksiyonların şekillenmesi bu uygulamaların en büyük sakıncasıdır (Meeusen vd., 2007).

Son yıllarda kullanılan moleküler tekniklerle genlerde delesyon/mutasyon yapılabilmekte ve bu teknolojiyle istenilen spesifik gen yada genler devre dışı bırakılarak canlı aşılar elde edilebilmektedir. Metabolik süreçlerde rol alan genlerin delesyonu ile bakterilerin yayılması engellenirken, bu canlı aşılar organizmaların yabancı tip bakterilere karşı bağışıklık sistemini geliştirmekte kullanılır.

Moleküler tekniklerle ya da pasajlarla virülanslık geni mutasyona uğratılmış atenué bakteriler canlı aşı olarak kullanıldıklarında, bu bakteriler tekrardan hastalık yapma özelliği kazanabilmektedirler. Bu durum hem çevre hem de canlı açısından risk teşkil etmektedir. Bu tür sorunlarla karşılaşmamak için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bunlardan birisi de; bakterilerin metabolik ağlarında rol alan genlerin inaktivasyonu ile mutant bakteri elde edilmesidir. Bakterilerin büyümeleri için gerekli olan pürin biyosentezi, kapsül biyosentezi, galaktoz epimeraz, adenil siklaz ve aromatik aminoasit biyosentezi engellenerek bakteriler mutant hale getirilebilir (Tatum ve Briggs, 2005). Bu mutantlar hastalık yapabilmek için sayılarını arttıramadıkları gibi hastalık oluşturmak için yeterli süre yaşamlarını sürdüremezler (Roberts vd., 1990). Aromatik aminoasit sentezi için bakteriler doğrusal bir biyokimyasal sentez ağına sahiptirler. Şikimat biyosentez ağına rol alan *aroA* geni 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentetaz enzimini, *aroC* geni ise korismat sintaz enzimini kodlar. 5-enolpiruvil şikimat-3-fosfat sentetaz enzimi 3-fosfoşikimat'ın 5-O-(1-karboksivinil)-3-fosfoşikimata dönüştürülmesini sağlarken, korismat sintaz enzimi 5-O-(1-karboksivinil)-3-fosfoşikimatın korismata dönüşümünü sağlamaktadır. Korismat ise aromatik amino asitlerin biyosentezinde ana aracı görevi yapmaktadır (Johansson ve Liden, 2006; Kitzing vd., 2004; Oyston vd., 1996; KEGG Patway, http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?eco00400+b0908).

Aeromonas hydrophila, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella ictaluri*, *Photobacterium damsela* spp. *piscicida* enfeksiyonlarına karşı balıkların korunması amacıyla bu bakterinin farklı genleri (özellikle *aroA* geni) farklı yöntemlerle mutasyona uğratılarak canlı atenué aşı olarak denenmiş ve balıklarda yüksek oranlarda koruma sağladığı tespit edilmiştir (Marsden vd., 1996; Thune vd., 1999; Thune, vd., 2003; Grove vd., 2003; Vivas, 2004). 2005 yılında *Y. ruckeri*'nin auxotrophic *aroA* geni mutasyona uğratılarak canlı aşı deneyimleri yapılmış olup, gökkuşağı alabalığının yersinioz hastalığına karşı %90 koruma sağladığı ve aşı olarak verilen bakterilerin de 48 saat içerisinde organlardan temizlendiği belirlenmiştir (Temprano vd., 2005). Virülanslı zayıflatılmış canlı aşı şimdiye kadar Amerika'da yayın balığı (*Ictalurus punctatus*) endüstrisinde, *Edwardsiella ictaluri* ve *Flavobacterium columnare* bakterilerinin sebep oldukları hastalıklara karşı kullanılmak üzere Intervet tarafından lisanslanmıştır. *Y. ruckeri*'nin *aroA* geni daha önce mutasyona uğratılmasına rağmen aynı bakterinin *aroC* geni ve *L. anguillarum*'un hem *aroA* hem de *aroC* geninin mutasyona uğratılarak herhangi bir aşı denemesi yapılmamıştır.

Bu proje ile virülant *Y. ruckeri* RB0708 ve *L. anguillarum* LMG10861'in hem *aroA* hem de *aroC* genleri aynı anda mutasyona uğratılarak, bakterilerin çoğalmaları için gerekli olan aromatik amino grup asit biyosentez ağının işlevinin yok edilmesi ve balıkta enfeksiyon yapma özelliği ortadan kalkan bakterilerin canlı aşı olarak kullanılması amaçlanmaktadır. Bu çalışmada iki genin fonksiyonu ortadan kaldırılacağı için aşılardan daha güvenli ve etkili olacağı düşünülmektedir. Diğer yandan iki geni mutasyona uğrayan bakterilerin, bazı amino asitlerin ve şekerlerin yokluğunda tekrar çoğalabilme yeteneklerini kazanma olasılıkları çok düşük olduğundan, bu aşılardan herhangi bir çevresel yan etkilerinin olması beklenmemektedir.

Tarım Çalışma Alanı Örneği:

Diğer geofit türlerinde ülkemizde yapılan benzer kültüre alma çalışmaları ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcut olup; Dilbirligi ve Arslan (1998), *Galanthus elwesii*'de soğan boylarının çiçeklenme oranına büyük bir etkisinin olduğunu ve soğanlar irileştikçe çiçeklenme oranının arttığını belirtmişlerdir. Arslan ve ark., (1998), *G. elwesii*'de soğanların hasat edilmeden aynı yerde üç yıl kendi halinde bırakıldıklarında çiçeklenme oranında önemli artışlar olduğunu tespit etmişlerdir. Proje kapsamında da yapılan çalışmalarda da benzer bulgular elde edilmiştir. Arslan ve ark., (1998), *Galanthus elwesii*'de meyve bağlama oranının yıllara ve soğan boylarına göre önemli düzeyde arttığını belirtmişlerdir. Genel olarak bakıldığında her iki türde de soğan iriliği arttıkça bitki, boyu, yaprak boyu, meyve tutma oranı ve yavru soğan oranının arttığı görülmektedir. Söküm zamanı geciktikçe (deneme boyunca yapılan vejetasyon gözlemlerinde) soğanların irileştigi gözlemlenmiştir. Benzer olarak, Sarihan ve Arslan (1998), *G. elwesii*'de ticari boyun altındaki küçük soğanlarla yaptıkları çalışmada hasat zamanlarına göre yavru soğan oranının ortalama % 3.23-7.85 arasında değiştiğini ve geç hasat edilenlerde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Arslan ve ark., (1998), Sarihan ve Arslan (1998), Dilbirligi ve Arslan (1998), *G. elwesii*'de soğan boylarında az veya çok artış olduğunu, bunun yörelere, soğan iriliğine ve dikim zamanına göre farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Ülkemizde *Crocus* türlerinin kültüre alınması ile yapılan çalışmalarda, Arslan ve ark (2006a) farklı dikim derinliklerinin ve soğan boylarının safran (Crocus sativus L.) çiçeklenmesine ve çoğalmasına etkisi üzerine yaptıkları araştırmada, bitki başına soğan sayısı 1.46-4.16 adet arasında, stigma verimini ise 77.7-583.1 g/da olduğunu bildirmişlerdir. Arslan ve ark (2006b) farklı hasat zamanlarının ve soğan boylarının safran (Crocus sativus L.) çoğalmasına etkisi üzerine yaptıkları araştırmada, soğan verimi ve stigma verimi her yıl hasat edildiğinde ortalama 805.8 kg/da ve 448 g/da, iki yılda bir hasat edildiğinde 462.4 kg/da ve 260 g/da olduğunu bulmuşlardır. İpek ve ark. (2009), safran (Crocus sativus L.)'ın kültüre alınması ile yaptıkları çalışmada soğanların çoğalmasında kültürel tedbir olarak dikim derinliğinin ve soğan boylarının safran çoğalmasına etkisi araştırılmıştır. Farklı boylardaki safran soğanları denemenin ilk yılında 20 x 10 cm aralıkla 5, 10 ve 15 cm derinliğinde dikilmiş ve iki yıl sonra hasat edilmiştir. Dikim derinliği ve soğan boylarının hem safran çiçeklenmesine, hem de yavru soğan olusturmasına etkili olduğu bulunmuştur. Uranbey ve ark. (2009), *M. azureum* ve

M.aucherî'nin kültüre alınması ile yapılan çalışmalarda, farklı soğan irilikleri ve dikim sıklıkları denenmiştir. Soğan irilikleri ve dikim sıklıkları arttıkça bitki, boyu, yaprak boyu, meyve tutma oranı ve yavru soğan oranının arttığı görülmüştür. M.azureum ve M.aucherî'de en yüksek yavru soğan oluşturma oranına ve yavru soğan adedine 4 cm'lik dikim sıklığında ulaşılmıştır. M.azureum'da I. deneme yılında hiç yavru soğan elde edilemezken, II. yılda 4 cm'lik dikim sıklığında ortalama 4.04 adet yavru soğan elde edilmiştir. Buna karşılık, M.aucherî'de ise denemenin II. yılında en yüksek yavru soğan adedi (5.43 adet) 2cm'lik dikimden ve 3 cm soğan çevresine sahip soğanlardan elde edilmiştir.

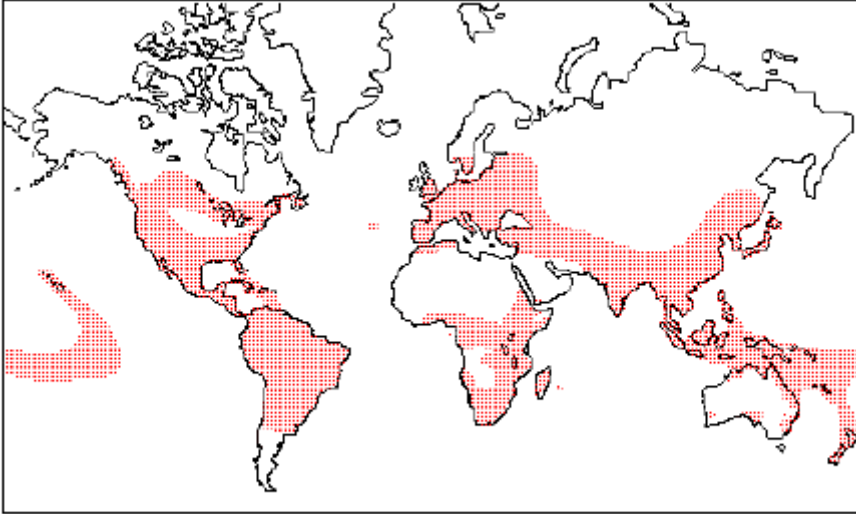
Doku ve hücre kültürlerinden etkili bir rejenerasyon yönteminin oluşturulması son derece önemli olup, doku ve hücre kültürü araştırmalarının başarısı güvenilir bir kallus kültürü ve bitki rejenerasyon sistemine bağlıdır. Bitkilerde düşük adventif sürgün rejenerasyonu karşılaşılan en önemli problemlerden biridir. Sürgün rejenerasyon kabiliyeti, kullanılan bitkinin genotipi, eksplantın fizyolojik durumu, kültür ortamının ışık ve sıcaklık gibi fiziki şartlarından önemli ölçüde etkilenmektedir. Doku kültüründe, uygun eksplant seçimi, rejenerasyonu etkileyen önemli faktörlerden olup, her organ ya da dokunun rejenerasyon kapasitesi farklıdır. Bitki büyüme düzenleyicileri in vitro kültürde bitki rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörlerin başında gelmekte olup oksin-stokinin dengesi, yüksek oranda bitki rejenerasyonu için şarttır. Ayrıca doku kültürlerinde kullanılan eksplant tipi bitkilerde rejenerasyon kapasitesini belirleyici faktördür. Soğanlı bitkilerin doku kültürü ile hızlı çoğaltımda çok sayıda eksplant tipi kullanılmaktadır. Doku kültürü ile soğanlı bitkilerde; sürgün ucu (*Lilium longiflorum*; Nhut, 1998), yapraklar (*Acampe praemorsa*; Nayak, ve ark., 1997), ovaryum (*Crocus sativus*; Bhagyalakshmi, 1999), soğan pul yaprağı (*Fritillaria thunbergii*; Paek ve Murthy, 2002, *Lilium candidum*, Baktir ve ark., 2003; *Sternbergia fischeriana*, Mirici ve ark., 2005; *Sternbergia clusiana*, Günaydın, 2004; *Galanthus ikariae*, Tıpırdamaz ve ark., 1999) olgunlaşmamış embriyo (*Muscari muscarum*, Parmaksız ve ark., 2005; *S. candida*, Arslan ve ark., 2003) kök uçları (Hasegawa, 1992; Kerbauy, 1993), olgunlaşmamış çiçek parçaları (Richwine ve ark., 1995) ve olgunlaşmamış çiçek sapları (Slabbert ve ark., 1995) gibi çok sayıda eksplant tipi kullanılmaktadır. Son 15 yılda geofit türleri ile yapılan in vitro klonal çoğaltım çalışmalarında, Ault vd (1995), Eucomis zambesiaca, E. comasa, E. autumnalis'in çift pul yapraklarını in vitro'da sürgün oluşumu için 4.4, 11.1 ve 22.2 µM BA ve 5.4 µM NAA içeren MS ortamlarında kültüre almışlardır ve yüksek oranda in vitro sürgün ve soğancık elde etmişlerdir. Nayak, Patnaik ve Rath (1997), yaptıkları çalışmada Orkide (*Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and Mc Cann) de 1. ve 2. genç yaprakları 100 mg/l myo-inositol, % 3 sukroz, 1 mg/l TDZ % 0.8 agar içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır ve yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonunu başarmışlardır. Meydana gelen sürgünlerin % 2 phytigel, %3 sukroz, 2mg/l IBA içeren MS ortamında köklenmeyi bildirmiştir. Ayabe ve Sumi (1998), yaptıkları çalışmalar sonucu Sarımsak (*Allium sativum* L.) da 1 mm'lik gövde diskini LS besin ortamında kültüre alarak, mikroçoğaltım yöntemi geliştirmişlerdir. Nhut (1998) yaptığı çalışmada ise Zambak (*Lilium longiflorum*)'da in vitro da elde edilen sürgünlerden, 2-3 nodlu ve 2-3 yapraklı 1cm' lik gövde parçalarını kullanarak 30 g/l sukroz, 2,3 µM BA, % 0.8 agar içeren ½ MS besin ortamında kültüre almış ve meydana gelen sürgünleri ve soğancıkları 20 g/l sukroz, 1.1 µM NAA içeren ½ MS ortamında köklendirmiştir. Bhagyalakshmi (1999) ovaryum hücrelerini kullanarak, % 4.5 sukroz, 400 mg/l L-glutamine, 100 mg/l askorbik asit, % 0.25 phytigel, içeren MS besin ortamında kültüre almıştır ve adventif sürgün rejenerasyonunu başarmıştır. Tıpırdamaz ve ark. (1999), kardelen (*Galanthus ikariae*Baker) bitkisinde soğan pul yapraklarını % 6 sukroz, 0.2 mg/l KNA, %7 agar, içeren MS besin ortamında kültüre almışlar ve adventif soğan rejenerasyonunu başarmışlardır. Ulrich ve ark. (1999), *Crinum lilies* bitkisinde üç yapraklı soğan disklerini kullanarak, % 6 sukroz, % 7 agar, 35.5 µM BA içeren MS besin ortamında 4 hafta sonra soğan pul yapraklarında adventif sürgün rejenerasyonunu rapor etmişlerdir. Suzuki ve Nakano (2001a), yaprak parçacıkları ve meristematik uçları kullanarak organogenez ve somatik embriyogenez yoluyla *Muscari armeniacum*'da sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Suzuki ve Nakano (2001b), yaptıkları çalışmada, *Muscari armeniacum*'da büyük, sarımsı ve nodular kallus oluşu 4.5 µM 2-4,D, 54 mM NAA içeren ortamda başlatmış, nodular kalluslar 0.44-44 µM IBA içeren ortama transfer edildiğinde yüksek oranda sürgün oluşumu meydana geldiğini bildirmişlerdir. *Lilium nepalense* de yapılan bir çalışmada olgunlaşmamış soğanlardan hazırlanan çift soğan pul yaprak eksplantları 20 µM Zeatin içeren MS ortamında kültüre alınmış ve çok sayıda sürgün elde edilmiştir. Wawrosch ve ark. (2001), *Lilium nepalense* bitkisinde ikili veya üçlü soğan pul yapraklarını %3 sukroz, %8 agar, 20 µM Zeatin, içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır ve pul yaprak disklerinden adventif sürgün rejenerasyonunu bildirmişlerdir. Arslan ve ark. (2002) Dağ yıldızı (*S. candida*)'nda yaptığı çalışmada olgunlaşmamış embriyoları % 3 sukroz, % 7 agar, 4 mg/l BAP + 0.25 mg/l NAA, içeren MS besin ortamında kültüre almıştır ve adventif sürgün rejenerasyonunun başarmıştır. Meydana gelen soğanları 1 mg/l NAA, % 0.5 aktif kömür 30 g/l sukroz içeren MS besin ortamında köklendirmiştir. Arslan ve ark. (2003), In vitro hızlı çoğaltım için *Sternbergia candida* ve *S. fischeriana* türlerin öncelikle soğan pul yaprak eksplantları farklı oranlarda büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında kültüre almışlardır. Soğancık oluşturan eksplant oranı (%75.99) ve eksplant başına soğancık sayısı (3.30 adet) birlikte düşünüldüğünde en yüksek soğancık oluşumu *S. candida* türünde 4 mg/l BAP ve 0.50 mg/l KNA içeren besin ortamında 2 pul yapraklı soğan eksplantlarından elde edilmiştir. *S. fischeriana*'da ise en yüksek soğancık oluşumu (% 76.67 ve 2.59 adet) 2 mg/l BAP ve 0.50 mg/l KNA içeren ortamda yine 2 pul yapraklı eksplantlardan üretilmiştir. Baktir ve ark. (2003), Miszambak (*Lilium candidum* L.) bitkisinde 0.5-1 cm soğan pul yapraklarını 0.30 ppm BA ve 0.03 ppm IBA içeren DMS besin ortamında kültüre almışlardır ve adventif soğan rejenerasyonunu başarmışlardır. Moran ve ark. (2003), *Cryanthus spiralis* bitkisinde yaptıkları çalışmada in vitro koşullarında ikili pul yapraklarından en iyi adventif ve yan soğan oluşumu 5 g aktif kömür içeren sıvı besin ortamında, 6 hafta sonunda rapor etmişlerdir. En iyi sürgün gelişimi 1 mg/l NAA-2 mg/l BAP içeren ortamda tesbit edilmiştir. Soğanlar %6 – 9 sukroz içeren ortamlara köklenme amacı ile aktarılması sonucunda ise %9 sukroz içeren besin ortamında gelişen soğanların hacim ve ağırlıklarının daha fazla olduğu gözlenmiştir. Günaydın (2004) *Sternbergia clusiana*' da Soğan pul yapraklarını % 3 sukroz, % 8 agar, 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, içeren MS besin ortamında kültüre almıştır ve Adventif sürgün rejenerasyonunu başarmıştır, elde edilen soğanların % 8 agar, % 3 sukroz 1mg/l NAA içeren MS besin ortamında köklenmelerini rapor etmiştir. Khawar ve ark. (2005), *Lilium candidum* L. (Mis zambak) bitkisinde yaptıkları çalışmalar sonucunda yaprak eksplantlarından değişik konsantrasyonlarında BAP-IBA içeren MS besin ortamlarında, adventif soğan rejenerasyonunu başarmışlardır. Parmaksız ve ark. (2005), *Muscari muscarum* bitkisinde Olgunlaşmamış embriyoları %3 sukroz, %7 agar, 4 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında kültüre almışlardır ve Adventif sürgün rejenerasyonunu başarmışlardır, meydana gelen sürgünler ise MS besin ortamında köklendirilmiştir. Sevimay ve ark. (2005), *Lilium candidum* bitkisinin pul yapraklarının alt kısımları ve in vitro' da gelişen yapraklarında adventif soğan oluşumunu rapor etmişlerdir. Besin ortamı ise 2.22 µM BAP ve 2.69 µM NAA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Nasırcılar ve Karagüzel (2006), *Galanthus elwesii* Hook. bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada olgunlaşmamış embriyoları kullanarak in vitro çoğaltımını başarmışlardır. En yüksek soğancık oluşumu ise 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren MS besin ortamında elde edilmiştir. Özel ve Khawar (2007), *Ornithogalum oligophyllum* bitkisinde yaptıkları

çalışmada ikili pul yapraklarından adventif soğan oluşumunu rapor etmişlerdir. En iyi sonuç ise 2 mg/l BAP 0.5 mg/l IBA içeren MS besin ortamında gözlenmiştir. Özel (2008) M.muscarimi, M. macrocarpum, M.neglectum ve M.adilii türlerinin in vitro çoğaltımı için yaptığı çalışmada, M. muscarimi'de en fazla soğan 19 adet ile 4 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA içeren MS ortamında, M. macrocarpum'da en fazla soğan eksplant başına 6 adetle 2 mg/l KIN ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında, M. neglectum'da en fazla soğan 8.25 adetle 0.1 mg/l TDZ ve 2 mg/l NAA içeren MS ortamında, M. adilii'de ise, en çok soğan 15.75 adet ile 4 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamından elde etmiştir.

Orman Çalışma Alanı Örneği:

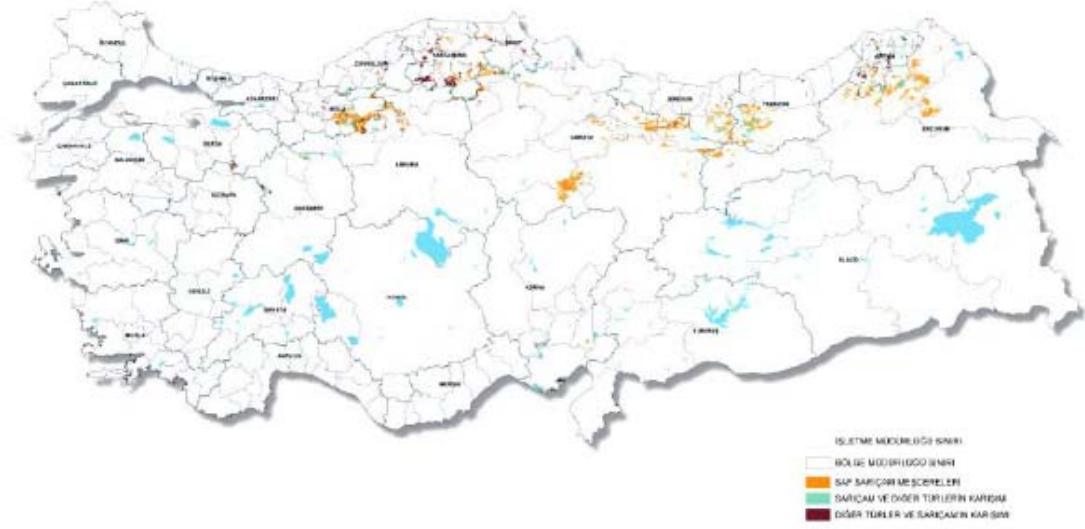
Araştırma konusu olarak ülkemiz ormanlık alanlarında çok geniş bir yayılışa sahip ve yarı parazit bir bitki olan ökseotunun sarıçam ağaçlarının çap artımına etkisini ortaya koymak ve sarıçam alanlarındaki yayılışını belirlemektir. Sarıçam ülkemiz için ekonomik değeri yüksek asli ağaç türlerimizden bir tanesidir. Kapladığı 1.2 milyon hektarlık alan ile, ibrelili türler içerisinde kızılçam ve karaçamdan sonra üçüncü en geniş yayılış alanına sahiptir. Bozuk, müdahale görmüş ve kapallığı kırılmış sarıçam meşçerelerinde ökseotu zararı büyük artım kayıplarına sebep olabilmektedir. Bundan dolayı, ökseotunun yayılış alanlarının fizyografik ve edafik faktörlere göre belirlenerek potansiyel yayılma alanlarının ortaya konulması ve artım kayıplarının belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Elde edilecek sonuçlar bu konuda gerçekleştirilmiş bilimsel çalışmaları tamamlar ve literatüre katkı sağlar nitelikte olacaktır. Ayrıca, ökseotunun çap artımına olan etkisinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler son beş, on ve onbeş yıllık çap artımı değerleri üzerinden yapılan değerlendirmeler olmasına rağmen bu çalışma kapsamında ökseotu yaşı ve miktarı, ibre miktarı ve ağaç çap artımı arasındaki ilişkiler ortaya konularak bir modelleme çalışması yapılacaktır. Böylece, meşçere büyüme modellerine de katkıda bulunabilecek sonuçlar ortaya konulacaktır.

Orman ekosistemlerin değişimi, gelişimi ve şekillenmesinde biyotik ve abiyotik etmenlerin çok önemli rolleri vardır. Biyotik etmenlerden bazıları ağaç türlerinde parazit ve yarı parazit olarak yaşayan bitkilerdir. Bu bitkilerin başında ökseotları gelmektedir. Ökseotu (*Viscum album* L. (*Viscaceae*)) yarı parazit bir bitki olup dünya genelinde geniş bir yayılış alanına sahiptir (Şekil 1). *Viscaceae* familyasının bilinen 7 cinsi ve yaklaşık 365 türü bulunmaktadır (Coder 2008). Bu familyanın 3 cinsi (*Arceuthobium*, *Phoradendron* ve *Viscum*) ağaçların gerek teknolojik özelliklerinde gerekse hayatıyeti üzerinde ciddi zararlara sebep olmaktadır. Çalışma kapsamında değerlendirilecek olan tür *Viscum album* L. dir. Bu türün bilinen 3 alt türü bulunmaktadır. Bunlar; *V. album* ssp. *album* (yapraklı ağaç ökseotu), tüm yapraklı ağaçlarda; *V. album* ssp. *austriacum* (çam ökseotu), çamlarda ve ender olarak ladinlerde; *V. album* ssp. *abietis* (Gökmar ökseotu), gökmarlarda zarar yapmaktadır (Yüksel vd. 2005). Ökseotları çamlar üzerinde, tepe yapısının bozulması, konukçunun boy ve çap gelişimi, yaprak uzunluğu, yaprak sayısının azalması ve dallara yapısal farklılıkların oluşmasına sebep olmaktadır (Ringling vd, 2010).



Şekil 1. *Viscaceae* Familyasının Dünya'daki Yayılışı (Anonim, 1998)

Sarıçam, ökseotunun arız olduğu önemli bir ağaç türümüzdür. Bu tür, ülkemizdeki en önemli yayılışını Kuzeydoğu Anadolu, İç Anadolunun kuzeyi ve Orta Karadeniz bölgelerinde yapmaktadır (Şekil 2). Son orman varlığı değerlerine göre 1.2 milyon hektarlık bir alanda yayılış göstermektedir (OGM, 2011). Kapladığı bu alan ile sarıçam, ibrelili türler içerisinde kızılçam ve karaçamdan sonra üçüncü en geniş yayılış alanına sahiptir. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde ökseotunun yoğun olarak bulunduğu ve zararının gözlemlendiği alanlar bozuk, suşsüz müdahale görmüş ve kapallığı kırılmış sarıçam alanlarıdır (Şekil 3). Ülkemizdeki bütün sarıçam ormanları insan müdahalesine uğramış ve bu durum ormanlar üzerinde doğrudan ve dolaylı çeşitli etkilere sebep olmuştur. Sarıçamın gelişimi üzerine her zaman için cansız çevre faktörlerinin birinci derecede etkili olmadığı, dolayısıyla, bu ağaç türünün büyüme ve gelişimine etki eden biyotik faktörlerin etki derecesinin de bilinmesi gerektiği ortaya çıkmıştır (Çepel vd, 1978). Bu gerçekten hareketle uygun olmayan yetiştirme ortamı özelliklerine sahip yerlerde bulunan ve insan faaliyetlerinden aşırı derecede etkilenmiş olan sarıçam ormanlarında, ağaçların münferit gelişimini etkileyen önemli faktörlerden birisinin ökseotu (*Viscum album* L. subsp. *austriacum* Wiesb.) olduğunu söylemek mümkündür (Eroğlu, 1993).



Şekil 2. Sarıçamın Türkiye'deki yayılışı (OGM, 2006)



Şekil 3. Çalışma alanında ökseotu bulaşmış bir sarıçam ağacı.

Işık, su ve mineral besin maddesi ökseotu tohumlarının konukçunun üzerinde çimlenip gelişebilmesi için en önemli faktörlerdir (Norton ve Reid, 1997). Ökseotları arız oldukları ağaçların su ve mineral besin maddelerini kullanarak, ağaçların normal gelişimlerini engeller ve bitkiyi zayıflatarak ikincil faktörlerinde etkisiyle (kuraklık, böcek, mantar vb.) kurumalara da neden olabilir (Dobbertin ve Ringling, 2006). Bundan başka bulunduğu dal kısımlarında ve gövdelerde şişkinlikler meydana getirerek bu kısımların ekonomik anlamda değerlendirilmesine engel olur. Ayrıca, ağacın tohum veriminde azalma ve artım kaybı görülür (Yüksel vd, 2005). Ökseotlarının transpirasyon oranı, konukçusunun transpirasyon oranından daha yüksektir (Ullman vd, 1985). Bu yüzden konukçunun bünyesindeki su oranı, ökseotunun yayılması, meşcere içinde ve ağaçların üzerindeki sayılarının artmasında önem teşkil etmektedir.

Ökseotu'nun bir konukçunun farklı dallarına veya diğer konukçulara yayılmasındaki en temel etken şüphesiz kuşlardır (Zuber ve Widmer, 2000; Watson, 2001; Aukema ve Martínez del Rio, 2002; Briggs, 2003; Zuber, 2004; Yüksel vd. 2005; Kartoolinejad vd, 2007; Kumbaslı vd, 2011). Meyvesi kuşlar tarafından sevilerek yenir. Yapışkan olduğu için, gagalarını ağaçlara sürten kuşlar, tohumların yayılmasını sağlar. Birçok parazit bitkinin tohumlarının çimlenebilmesi için konukçuların bünyesinde kimyasal bir değişikliğin meydana gelmesi gerekirken (Musselman ve Press, 1995), ökseotu tohumlarının konukçunun üzerine çimlenebilmesi için uygun büyüklükte bir dal bulması yeterlidir.



Ökseotunun yayılışı üzerine farklı konukcu türleri ve bölgelerde çalışmalar mevcuttur. Doğu Karadeniz Bölgesi Giresun ve Artvin Trabzon illeri, sarıçam ormanlarında (Eroğlu vd, 1993; Eroğlu vd, 1995) ve Marmara Bölgesi meşe ormanlarında (Kumbaslı et al, 2011) tür ayrımı yapılmadan genel yayılış ve konukcu seçimi üzerine (Ergün ve ark., 1994) yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ökseotunun bulunuşu ve yayılışı ile çevre faktörleri arasındaki ilişkinin ortaya konulması için çok yoğun çalışmalar dünya genelinde de yapılmaktadır (Hawsworth ve Scharpf, 1986; Dobbartin vd., 2005; Swanson vd., 2006) Ökseotunun çap artım üzerine etkisi konusunda ülkemizde farklı türlere ilişkin yapılan çalışmalar mevcuttur. Doğu Karadeniz Bölgesi sarıçam ormanlarındaki yayılışı (Eroğlu vd, 1995; Eroğlu vd, 1995), Batı Akdeniz Bölgesinde karaçam (*Pinus nigra* Arnold) ormanlarında (Çatal ve Carus, 2011), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde karaçam türünde gerçekleştirilmiştir (Kanat vd, 2011). Yapılan çalışmalar sonucunda ökseotunun çap artımı üzerine olan etkisi sarıçam türünde %53'e, karaçam türünde ise %60'a varan oranlarda artım kayıplarının olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar örnekleme yapılan alanlarda ortalama (son beş ya da 10 yıllık) artım kayıplarını vermektedir. Dünyada da ökseotunun artım üzerine olan etkisi ile ilgili olarak birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen ((Scharpf, 1979; Mathiasen et al, 1990; Barbu, 2009), bu çalışmalarda da ökseotu yoğunluğu ve çap artımı ilişkisi çoğunlukla ortalama artımlar üzerinden ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda, ökseotu ve ağaçların yaprak miktarı ile ekofizyolojik ilişkiler genelde ele alınmamıştır. Bu ilişkilerin ortaya konulması ökseotunun ağaç gelişim ve büyümesi üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir. Mevcut proje önerisinde böyle bir yaklaşım takip edilmiştir.

4. ÖZGÜN DEĞER

Proje önerisinin, özgün değeri (bilimsel kalitesi, farklılığı ve yeniliği, hangi eksikliği nasıl gidereceği veya hangi soruna nasıl bir çözüm geliştireceği ve/veya ilgili bilim/teknoloji alan(lar)ına metodolojik/kavramsal/kuramsal olarak ne gibi özgün katkılarda bulunacağı vb.) ayrıntılı olarak açıklanmalıdır.

Gıda Çalışma Alanı Örneği:

Bu zamana kadar özellikle ülkemizde enzim üreten farklı mikroorganizmaların izolasyonu, karakterizasyonu, yeni rekombinant mikroorganizmaların geliştirilmesi, enzim üretimi, üretim şartlarının optimizasyonu, elde edilen enzimlerin saflaştırılması üzerine bağımsız olarak gerçekleştirilen birçok çalışma bulunmaktadır. Günümüzde fermentasyonla enzim üretimi konusunda gerçekleştirilecek araştırmalarda temel amaç, üretim şartlarının optimize edilerek mümkün olan en düşük maliyetle en yüksek faydayı sağlayacak saflıkta mannanaz üretmek olmaktadır.

Bu projede farklı karbon kaynaklarından Rekombinant *Aspergillus sojae* (ATCC 11906) kullanılarak kesikli beslemeli (fed-batch) derin kültür fermentasyonunda mannanaz üretimi gerçekleştirilecektir. *Aspergillus fumigatus* (IMI 385708) endo- β -1,4-mannanaz üreten doğal bir patojen fungal mikroorganizmadır. Ancak bu mikroorganizmanın patojen olması nedeniyle, ürettiği mannanaz enzimi gıda endüstrisinde kullanılamamaktadır. Üretilen enzimin gıda endüstrisinde kullanılabilmesi için kullanılan mikroorganizmanın GRAS (Generally Recognized As Safe) listesinde yer alması gerekmektedir. Bu nedenle *Aspergillus fumigatus* (IMI 385708) mikroorganizmasının endo- β -1,4-mannanaz geninin proteini kodlayan bölgesi izole edilerek toksin üretmediği için GRAS listesinde yer alan *Aspergillus sojae*'ye transfer edilmiş ve yüksek seviyede endo- β -1,4-mannanaz üreten Rekombinant *Aspergillus sojae* (ATCC 11906) geliştirilmiştir (Duruksu vd. 2009). Ayrıca bu yeni suş endo- β -1,4-mannanaz üreten doğal ve rekombinant mikroorganizmalar arasında en yüksek endo- β -1,4-mannanaz aktivitesine sahip fungal kaynaklı bir suştur. Bu nedenle projenin, genetik olarak ülkemizde geliştirilen böyle bir mikroorganizmanın üretimi, üretim şartlarının geliştirilmesi, elde edilen enzimin saflaştırılması ve çalışma şartlarının belirlenerek muhafazası ve endüstride kullanımına yönelik deneysel çalışmaları içermesi açısından özgün olduğu görülmektedir.

Söz konusu mikroorganizmayı rekombinant olarak üreten çalışma grubu ve sunulan projenin yürütücüsü flask denemeleriyle fermentasyon ortamlarında farklı substratları kullanarak çalışmalar gerçekleştirmiş ancak mannanaz enziminin farklı fermentasyon stratejileri kullanılarak üretimin daha üst seviyelere çıkması adına çalışmalarda bulunmamışlardır. Projede kesikli fermentasyona göre hem hücre gelişimi hem de üretilen ürün miktarının fazlalığı açısından üstün yönleri sahip yarı kesikli beslemeli fermentasyon yöntemi kullanılacaktır. Uluslararası yayın gruplarındaki dergiler (Web of Knowledge ve Scopus vd.) incelendiğinde mannanaz üretimi ile ilgili kesikli beslemeli fermentasyon çalışmalarına ait araştırmalar görülmemektedir.

Ancak benzer fungal enzim üretimlerinde yöntemin kullanıldığı ve başarılı sonuçlar alındığı literatürden görülmektedir. Projede kullanılan rekombinant *Aspergillus sojae* flask denemeleri ile fermentasyonda 8 günde 400-500U/mg aktivite değerine sahip enzim üretmektedir (Turhan 2012). Uygulanacak yarı kesikli beslemeli fermentasyon (özellikle pH kontrolü ve oksijen etkisi) ve farklı immobilizasyon yöntemleriyle birlikte, projede, daha yüksek enzim aktivitesine sahip mannanaz enzimi üretimine mevcut süreden daha kısa zamanda ulaşılmış olacaktır. Tüm bunlar göz önüne alındığında proje, rekombinant *Aspergillus sojae*'den mannanaz üretimlerinin farklı fermentasyon teknikleri kullanılarak geliştirilmesi yönüyle de özgün görülmektedir.

Veteriner Çalışma Alanı Örneği:

Önerilen araştırma projesinin özgünlüğü aşağıda sıralanmıştır.

- 1- Ülkemizde, son yıllarda önemli halk sağlığı sorunlardan olan KKKAH'a karşı geliştirilen hücre tabanlı inaktif aşı ile immunize edilen Balb/c farelerinde hücresel immün yanıt belirlenecektir.
- 2- KKKAH NP ve Gn antijenlerinin T hücrelerini spesifik olarak aktive eden immunodominant bölgeleri tanımlanacaktır. Konuyla ilgili 2012 yılında insanlarda yapılmış tek bir çalışma mevcuttur. Çalışmada sadece NP antijenlerine karşı T hücrelerini spesifik olarak aktive eden immunodominant bölgeler çalışma kapsamına alınmış olup örnek sayısının yetersizliği nedeniyle immunodominant bölgeler belirlenememiştir. Önerilen araştırma projesinde, hücre tabanlı inaktif aşı ile immunize edilen Balb/c farelerinde NP ve Gn proteinlerinin T hücrelerini spesifik olarak aktive eden immunodominant

bölgelerinin ilk kez identifiye edilecek olması projeye özgünlük kazandırmaktadır.

- 3- İnaktif KKKAH aşısına spesifik olarak oluşan hücresel immunitenin önemli indikatörlerinden olan IFN-gama'nın hangi düzeyde yardımcı T hücreleri (CD4) ve sitotoksik T hücreleri (CD8) tarafından üretildiğinin belirlenecek olması, bu konuda dünyada ilk verilerin elde edilmesini sağlayacaktır.
- 4- Aşılama sonrası immun yanıtın Th1 ya da Th2 yollarından hangisini kullandığına cevap aramak için IFN-gama, TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-5 ve IL-10 sitokinleri araştırılacaktır. Literatür özetinde ayrıntılı olarak belirtildiği gibi sadece hastalığın şiddeti ile sitokin düzeyleri arasındaki ilişkileri araştırılan çalışmalar mevcuttur. Aşıya bağlı oluşan sitokinlerin deney hayvanlarında ilk kez araştırılacak olması proje önerisinin bir başka özgün yönüdür.
- 5- Koruyucu özellikte olan nötralizan antikor yanıtının da ortaya konulmasıyla KKKAH'a karşı geliştirilen inaktif aşının immun sistemi hücresel ve humoral olarak hangi düzeyde uyardığı belirlenecektir. Böylece, elde edilen veriler bütünsel olarak değerlendirilebilecektir.

Proje kapsamında yapılacak olan, T hücrelerini spesifik olarak aktive eden immunodominant bölgelerinin belirlenmesi, ELISPOT ve akım sitometrisi deneylerinin konuyla ilgili olarak adapte edilmesi gelecekte KKKAH aşısı immunolojisiyle ilgili yapılacak çalışmalar için temel oluşturacaktır.

Su Ürünleri Çalışma Alanı Örneği:

Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan balıklar bakteriyel hastalıklar bakımından incelendiğinde tatlı suda en fazla *Y. ruckeri*'nin sebep olduğu yersiniyöz hastalığı görülürken, deniz suyunda da en fazla *L. anguillarum*'un sebep olduğu vibriosiz hastalığı görülmektedir. Bu hastalıklardan balıkları uzun süreli korumak için bu bakterilerin hem *aroA* hem de *aroC* genleri delesyon yapılarak mutan atenüe canlı aşı yapılacaktır. Çifte gen mutasyonu, *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum*'da ilk kez uygulanacak ve üretilen mutantların canlı aşı olarak kullanıma potansiyelleri araştırılacaktır. *Y. ruckeri*'nin *aroA* geni daha önce mutasyona uğratılmasına rağmen, aynı bakterinin *aroC* geni ve *L. anguillarum*'un hem *aroA* hem de *aroC* genlerinin mutasyona uğratılarak canlı aşı denemeleri daha önce yapılmamıştır. Bu bağlamda bu proje ilk olması nedeniyle özgün değer taşımaktadır. Canlı aşı üretildiğinde patent alma ve sonuçların Web of Knowledge ve Scopus'da kayıtlı dergilerde yayınlanma potansiyelleri yüksektir.

Tarım Çalışma Alanı Örneği:

Son yıllarda alınan bir çok tedbir sayesinde doğadan çiçek soğanlarının sökülüp ticaretinin yapılması kontrol altına alınmış olsa dahi, özellikle bu çiçek soğanlarının içerisinde yer alan ve endemik olan bazı türlerin doğal yetiştirme alanlarında korunması ve çoğalmasının sağlanması yanında bu bitkilerin hızlı bir şekilde kültüre alınma çalışmalarının da yapılması gerekmektedir. Bu çalışma ile de ülkemizde doğal olarak yetişen, endemik ve tehlike altındaki *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew alt türleri ile *Crocus speciosus*'un diğer alt türü olan *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türlerinde ilk defa kültüre alma çalışmaları yapılmış olacak ve ilk defa geniş tabanlı agronomik çalışmalar başlatılmış olacaktır. Bu türlerin kültüre alınması ve in vitro üretimi ile ilgili yerli ve yabancı literatüre rastlanmamıştır. Bu bitkilerin tarla koşullarında kültüre alınarak üretiminin uygulanabilirliği, safran (*Crocus sativus* L.) başta olmak üzere diğer *Crocus* türleri ve geofitler için kültüre alma çalışmalara ışık tutacaktır. Ayrıca, doku kültürü teknikleriyle bu türler üzerinde yapılacak olan in vitro rejenerasyon ve soğancık üretimi ile hızlı çoğaltım teknikleri bu türler üzerinde ilk kez test edilmiş olacaktır. Buna ek olarak uygun rejenerasyon metodunun geliştirilmesi bitkilere gen aktarımında önemli faktörlerden biridir. Doku kültürleri yolu ile yüksek frekansta somatik embriyogenesiz ilerideki gen aktarım çalışmalarını kolaylaştıracaktır. Geliştirilen bu yöntemin diğer *Crocus* ve geofit türleri için de kullanımının önü açılmış olabilecektir.

Ülkemiz gen kaynaklarının belirlenmesi ve bunların morfoloji ve moleküler düzeyde karakterizasyonu ve bu bilgilerin gelecekte çeşitlendirmeye yönelik bitki ıslahı programlarında etkin olarak kullanılması, son derece önemlidir. 2007 yılında kurulan Üniversitemiz alt yapısı geliştiğinde, ülkemizin değişik bölgelerinden toplanan bu türlere ait aksesyonların, moleküler düzeyde ilk defa karakterize edilerek, aksesyonlar arasındaki farklılıklar ve akrabalık ilişkileri belirlenerek kayıt altına alınması gelecekte diğer bir hedefimiz olacaktır.

Orman Çalışma Alanı Örneği:

İlk nano kompozit üretimi 1980'li yıllarda Toyota firması tarafından gerçekleştirilmiştir. O zamandan bugüne kadar birçok çalışma yapılmış ve bu çalışmaların büyük bir kısmı nano boyuttaki kil parçacıkları takviyeli nanokompozitler üzerine yoğunlaşmıştır. Son yıllarda doğal kökenli takviye elemanlarının kullanımına başlanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2006 yılında orman ürünleri alanında nanokompozit üretimi için bütçe ayrılmış ve ilki 2007 yılında olmak üzere 2008 ve 2009 yıllarında orman ürünleri kökenli nanokompozit ürünler alanında üç konferans gerçekleştirilmiştir. Bu projenin gerçekleştirilmesi ile elde edilecek başlıca özgün değerler aşağıda belirtilmiştir:

1. Ülkemizde nano boyutta inorganik materyal takviyeli nanokompozitler üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiş olmasına karşın orman ürünleri alanında ve doğal kökenli nano parçacık takviyeli termoplastik nanokompozitler üzerine yapılacak ilk çalışma olacak olması.
2. Dünyada yapılan doğal nano partikül takviyeli nanokompozit üretimi çalışmalarında genelde deniz hayvanlarından elde edilen çitosan ve çitin nano lif ve parçacık takviyeli nanokompozitlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Selülozdan elde edilen kristalitlerin (whiskers) nanokompozitlerde kullanımı denenmiş fakat kristalitlerin hidrofilik oluşları nedeniyle termoplastik polimer matris içerisinde homojen dağılım göstermemiştir. Kimyasal yapıların değiştirilmesi için perklorik asit veya derişik mineral asitler eşliğinde asetik anhidrit ile modifikasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Perklorik ve mineral asitler organik materyallerin yapısını olumsuz etkilediğinden tam başarı sağlanamamıştır. Bu projede ilk kez iki farklı yöntem uygulanarak selüloz kristalitler modifiye edilecektir. A. Vinil esterler ile transesterifikasyon reaksiyonu (Lignoselülozik

malzemenin vinil esterler ile modifikasyonu 2007 yılından bu yana uygulanan yeni bir teknik olup (Jebrane ve Sebe, 2007) selüloz ve selüloz kristalitleri üzerine önceden denenmemiştir. Bu yöntemin asit anhidritlere göre en büyük avantajı yan ürün olarak asit oluşturmaması, ucuz oluşu ve temininde özel izin gerektirmemesi gelmektedir. B. Asit anhidritler ile modifikasyon (Selüloz nanokristalitlerin hidroforik hale getirilmesinde sadece asetik anhidritten faydalanılmış ve kataliz olarak perklorik veya mineral asitler kataliz olarak kullanılmıştır. Bu projede bu asit katalizleri kullanmaksızın yeni ılımlı katalizler eşliğinde dört farklı anhidrit ile modifikasyon işlemi gerçekleştirilecektir.

3. Literatüre bakıldığında selüloz nanokristalitler üzerine asetil grupları klasik asetik anhidrit tekniği ile bağlanılmaya çalışılmıştır. Bu projede kimyasal modifikasyon işlemi esnasında nanokristalit yüzeylerine sadece asit anhidritler ile değil yeni vinil esterlerle transesterifikasyon reaksiyonları ilk kez denenecek ve bu farklı iki yöntemin kristal yapı üzerine etkisi belirlenecektir.
4. Selüloz kristalitleri yüzeylerine farklı gruplar (2 C uzunluğunda asetil (asetik anhidrit veya vinil asetat ile), 4 C uzunluğunda bütiril (bütirik anhidrit veya vinil bütirat ile), 10 C uzunluğuna sahip dekanol (dekanolik anhidrit veya vinil dekanolat ile) ve 18 C uzunluğuna sahip stearil grupları (stearik anhidrit veya vinil stearat ile) bağlanacaktır. Bu gruplar ile termoplastik matris arasındaki etkileşim incelenecek ve bu grupların üretilen nanokompozitlerin mekanik ve fiziksel özellikleri üzerine etkisi belirlenecektir.
5. Ülkemizde mikrokristal selülozdan selüloz nanokristalit (whiskers) eldesi ve karakterize edilmesi, selüloz nanokristalitlerin modifiye edilmesi ve bu nanokristalitlerden termoplastik kökenli nanokompozit üretimi üzerinde ülkemizde yürütülmüş bir proje veya çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yapılan çalışma ülkemizde bir ilk olacaktır. Dünyada yapılan çalışmalarla selüloz kristalitlerin modifikasyonu üzerine çok az sayıda çalışma olup, modifikasyon için uyguladığımız yöntemler daha önce selüloz nano kristalitleri üzerine uygulanmamıştır. Bu tür modifiye edilmiş selüloz nanokristalit takviyeli nanokompozit üretimi ilk kez gerçekleştirilmiş olacaktır.

5. YÖNTEM

Projede uygulanacak yöntem ve araştırma teknikleri (veri toplama araçları ve analiz yöntemleri dahil) ilgili literatüre atıf yapılarak (gerekirse ön çalışma yapılarak) belirgin ve tutarlı bir şekilde ayrıntılı olarak açıklanmalı ve bu yöntem ve tekniklerin projede öngörülen amaç ve hedeflere ulaşmaya elverişli olduğu ortaya konulmalıdır.

Projede uygulanacak yöntem(ler)le ilerleme kaydedilememesi durumunda devreye sokulacak alternatif yöntem(ler) de belirlenerek açık bir şekilde ifade edilmelidir.

Gıda Çalışma Alanı Örneği:

1. Materyal

Materyal olarak Menderes/İzmir, Halilbeyli/İzmir ve Kemaliye/Manisa olmak üzere 3 farklı yöreden sağlanacak olan Bornova Misketi üzümü kullanılacaktır. Bu üç farklı yörenin özellikleri aşağıda verilmiştir;

Birinci Yöre: Menderes/İzmir yöresi; seçilen bağda 30 dekarlık alanda Bornova misketi yetiştirilmektedir. Denize en yakın bölge olup rakım 100m'dir. Bağda sıra arası 2,70 m ve sıra üzeri 1,5 m olacak şekilde, güney-kuzey yöneyinde duvar sistemi ile terbiye edilmiştir, toprak genel olarak tınlı-kumlu bünyeye sahiptir. Ancak ayrıntılı bir araştırma yapılmamıştır. Verim genelde bağda 500-600 kg/da olacak şekilde sınırlandırılmaktadır.

İkinci Yöre: Halilbeyli/İzmir yöresi; bu bağda da 30 dekarlık alanda Bornova Misketi üzümü yetiştirilmektedir. Birinci yöreye göre denizden daha içerde olan bu yörede rakım 130 m'dir. Sıra arası 2,50 m ve sıra üzeri 1,0 m olacak şekilde, kuzey-güney yöneyinde duvar sistemi ile terbiye edilmiş olan bağda toprak killi-tınlı bünyeye sahiptir. Verim genelde 500-600 kg/da olacak şekilde sınırlandırılmaktadır.

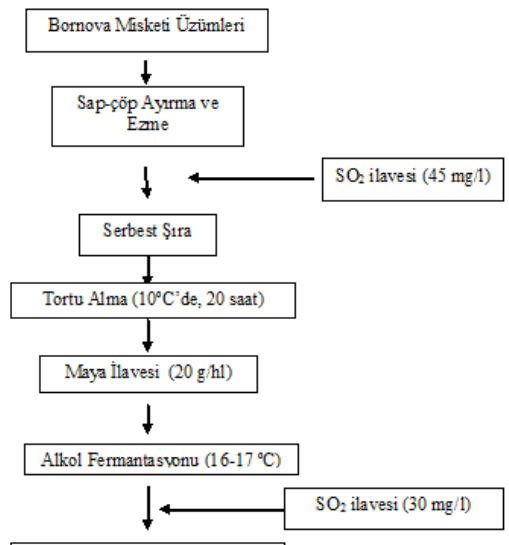
Üçüncü Yöre: Kemaliye/Manisa yöresi; bu bağda 90 dekarlık alanda Bornova misketi üzümü yetiştirilmektedir. Diğer iki yöreye göre daha yüksek ve denizden daha içerde bir yöredir ve iklim karasal geçiş iklimi özelliklerinin göstermektedir, rakım 250 m'dir. Toprak yapısı killi-kalkerlidir. Sıra arası 2 m ve sıra üzeri 1 m olacak şekilde, güney-kuzey yöneyinde duvar sistemi ile terbiye edilmiştir. Bağda verim ortalama 400-600 kg/da olacak şekilde sınırlandırılmaktadır.

Üç bağ alanında da damla sulama yapılmaktadır.

2. Yöntem

2.1. Şarap Üretim Yöntemi

Bornova Misketi üzümünden beyaz şarap üretim aşamaları Şekil 1'de verilmiştir. Çalışma Çukurova Üniversitesi pilot şarap işletmesinde gerçekleştirilecektir. İşletmeye 20'şer kg/lık plastik kasalarda uygun olgunlukta belirlenen yörelerden getirilen üzümler ilk olarak çöp ayırma ve ezme işlemine tabi tutulacaktır. Ezme sırasında 3 g/hl pektolitik enzim (Lafase Fruit, Laffort Enologie, Fransa) ilave edilecektir. Ezme işleminden sonra elde edilen serbest şıra, tortusunun ayrılması için 10 °C' de 20 saat bekletilecektir. Tortusundan ayrılmış ve bulanıklığı belli bir değere (120-150 NTU) ayarlanan şıra fermentasyon tankına alınacak ve 20 g/hl maya ilavesini (Zymoflore X 5, Laffort Enologie, Fransa) takiben 16-17 °C' de alkol fermentasyonuna terk edilecektir. Fermentasyonu biten şaraplar 5 °C' ye soğutulduktan sonra (1 gün sonra) dinlendirme tanklarına aktarılacaktır. Fermentasyon



2.2. Analiz Yöntemleri

2.2.1. Bağda Yapılacak Analizler

Şekil 1. Beyaz Şarap Üretimi

2.2.1.1. Fenolojik analizler

Asmanın fenolojik dönemleri gözlemlenecektir. Omcalara ait verim ve kalite değerlerini ifade eden verim (kg/omca), ortalama salkım ağırlığı (g), 100 tane ağırlığı (g), salkım en ve boyu (mm), tanenin en ve boyu (mm), pH, suda çözünabilir kuru madde (SKM, %), toplam asitlik (TA, g/100 ml), kroma ve Hue açısı değerlerine ait veriler alınacaktır.

Verim, Parselden elde edilen yaş üzüm tartımı toplamının, parseldeki omca sayısına bölünmesi suretiyle; ortalama salkım ağırlığı (g), parseldeki toplam yaş üzüm tartım değerinin yine parseldeki toplam salkım sayısına bölünmesiyle; 100 tane ağırlığı (g), parseli temsilen ve tesadüfen alınan 100 adetlik örnekte bulunan tanelerin tartımı ile; salkım en ve boyu (cm), parseli temsilen ve tesadüfen alınan 10 adet salkımın en ve boy ölçümleri ile; tanenin en ve boyu (mm), Mitutoyo Corporation otomatik kumpas ile parseli temsilen ve tesadüfen alınan salkımlardan alınan 100 tanenin en ve boy ölçümlerinin 100'e bölünmesi ile; pH, Mettler Toledo MP220 marka pH metre ile parselleri temsilen ve tesadüfen alınan örneklerin ölçülmesi ile; suda çözünabilir kuru madde (%), el refraktometresiyle parseli temsilen ve tesadüfen alınan salkımlardan alınan 100 tane örneğinden çıkarılan üzüm sırasında okunup gerektiğinde sıcaklık düzeltilmesi yapılmak suretiyle, toplam asitlik (g/100 ml), belirli miktarda üzüm suyunun 0,1 N NaOH ile bir pH metre yardımıyla pH 8,1'e kadar titrasyonu ile ölçülecektir (Ough ve Amerin, 1980).

Parlaklık (Lightness) değeri, CR300 Minolta renk ölçer aleti ile parseli temsilen ve tesadüfen alınan üzümlere ait tane örneklerinde ölçülecektir. Renkölçer ile ölçülen a ve b değerlerinin belirlediği noktanın gri olan merkezden uzaklığının ölçütü olan ve rengin canlılığını ifade eden Kroma değeri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanacaktır;

$$C^* = \left(a^{*2} + b^{*2} \right)^{1/2}$$

Renk tonu (Hue açısı): a ve b değerlerinin kesiştiği noktadan geçen doğrunun X eksenine yaptığı açıyı ifade etmektedir ve 0° olduğunda kırmızı; 90° olduğunda sarı; 180° olduğunda yeşil ve 270° olduğunda mavi rengi belirtmektedir. Renk tonu aşağıdaki eşitlikle hesaplanacaktır.

$$h^{\circ} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

2.2.1.2. İklimsel Verilerin Belirlenmesi

Şaraplık üzümlerin kalitesini etkileyen önemli faktörlerden biri olan iklimsel verilerin saptanmasında bilgisayar destekli ısı-nem kayıt cihazı kullanılarak; gece-gündüz sıcaklıkları, toplam güneşlenme süreleri, yıllık ortalama sıcaklık gibi veriler vegetasyon süresince ölçülecektir. Toplam yağış miktarları ise yöredeki meteoroloji istasyonundan elde edilecektir.

2.2.1.3. Toprak ve Yaprak analizleri

Toprak örneklerinde pH ve % toplam tuz, saturasyon çamurunda pH metre ve tuz köprüsü ile ölçülecektir. CaCO₃ (% kireç) volümetrik, Organik madde Walkley Black, bünne hidrometrik, toplam N modifiye Kjeldahl, alınabilir P Bingham, alınabilir K, Ca ve Mg 1N NH₄OAC yöntemi ile Fe, Zn, Cu ve Mn DTPA yöntemiyle belirlenecektir (Kacar, 1995).

Temizlendikten sonra 65-70 °C'de kurutulan örneklerde toplam N modifiye Kjeldahl yöntemi ile yapılacaktır. Yaş yakma yöntemiyle hazırlanan bitki ekstraktlarında P kolorimetrik; K ve Ca fleymfotometrik, Mg, Fe, Zn, Cu ve Mn ise Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (AAS) ile belirlenecektir (Kacar, 1972; Kacar, 1995).

2.2.2. Üzüm, Şıra ve Şarapta Yapılacak Analizler

2.2.2.1. Genel Analizler

Şırada toplam asitlik, pH, indirgen şeker analizleri, renk yoğunluğu ve renk tonu analizleri (Ough ve Amerine, 1988; Anon, 2005) yapılacaktır. Şaraplarda, şırada yapılan analizlere ek olarak, alkol, uçar asit, kurumadde, serbest ve toplam SO₂ analizleri (Ough ve Amerine, 1988; Anon, 2005) yapılacaktır.

Üzüm, şıra ve şaraplarda L*, a*, b* renk değerleri Hunter Lab renk ölçüm cihazı ile ölçülecektir. L*, a*, b* değerleri 3 boyutlu koordinat sistemi ile verilmekte ve bu koordinat sisteminde L* değeri dikey ekseninde parlaklıktan koyuluğa gidişi belirlerken +a* kırmızılığa, -a* yeşillığe, +b* sarılığa, -b* ise maviliğe gidişi göstermektedir. Ayrıca bu ölçümlere ilave olarak rengi tanımlamak için Croma değeri ($\sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$) ve hue açısı ($\arctan b^*/a^*$) değerleri hesaplanacaktır (Main ve Morris, 1994).

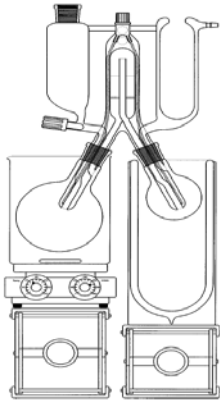
2.2.2.2. Serbest ve Bağlı Aroma Maddeleri Analizleri

Serbest aroma maddelerinin ekstraksiyonu

Serbest aroma maddelerinin ekstraksiyonunda. Engel ve ark., (1999), Frank ve ark., (2011) tarafından bildirilen yüksek vakum altında çözgen yardımıyla aroma ekstraksiyonu (SAFE) sistemi kullanılacaktır.

Aroma maddelerinin ekstraksiyonunda şıra ve şarap örnekleri için 100 ml örnek kullanılacaktır. Her 100 ml örneğe 10 g NaCl ilave edilecektir. Ekstraksiyon işleminde diklorometan çözgeni kullanılacak ve her bir örnek için üç kez tekrarlanacaktır. Örneklere iç standart olarak 40 µg 4-nonanol ve 100 ml diklorometan ilave edilecektir. Aroma ekstraksiyonu, yüksek vakum altında çözgen yardımıyla aroma ekstraksiyonu (Solvent Asisted Flavor Evaporation (SAFE)) sistemi (Şekil 2) ile gerçekleştirilecektir. Bu sistemde sol alt cam hazne 30-40°C'ye su dolu beher içinde ısıtılır. Sonra, bu SAFE aparatının sağ üst çıkışından bir difüzyon pompası vasıtasıyla yüksek vakum (10-3 Pa) uygulanır ve bu sırada damlatma hunisinin yüksek vakumlu vanası kapatılır. Daha sonra sıvı azot aparatın sağ üst haznesine doldurulur. Çözgen ile birlikte hazırlanan örnek sol üst damlatma hunisine doldurulur ve vana açılarak damlatma işleminin başlamasıyla ekstraksiyon başlamış olur. Uçucular ile çözgen ana kısımdaki sol tübe gelir. Distilat ana aparatın sağ tüp vasıtasıyla sıvı nitrojenin bulunduğu soğutma haznesinden geçerek toplama haznesinde toplanır.

Bu işlem sonucu elde edilen aroma maddelerini içeren çözgen faz "Vigreux" damıtma kolonunda 45°C' de 1 ml kalıncaya kadar konsantre edilecektir. Konsantre halde elde edilen sıvı doğrudan GC ve GC/MS' e enjekte edilerek serbest aroma maddeleri belirlenecektir.



Şekil 2. Çözgen yardımıyla aroma ekstraksiyon sistemi

Bağlı aroma maddelerinin ekstraksiyonu

Bağlı aroma için 100 g üzüm örneği alınacak ve 26000 devir/dakika hızla çalışan bir mekanik parçalayıcıda homojenize edildikten sonra elde edilen püre 0 °C' de 9000 g'de satrifüj edilecek ve serum kısmı ekstraksiyonda kullanılacaktır. Bağlı aroma maddelerinin analizinde iki önemli işlem vardır. Bunlardan birincisi, bağlı aroma maddelerini ekstraksiyonu, ikincisi ise bağlı aroma maddelerinin enzimatik yolla parçalanıp serbest hale geçirilmesidir.

Bağlı aroma maddelerinin ekstraksiyonunda C18 reçine içeren kartuş kullanılacaktır (Aubert ve ark., 2003; Ibarz ve ark., 2006). Kartuş kullanılmadan önce sırasıyla metanol, dietileter ve ultra saf su ile yıkanacak ve kullanım için hazır hale getirilecektir.

Örnekler C18 kartuştan geçirilerek serbest aroma maddeleri kartuşa bağlanacaktır. Daha sonra kartuştan şeker kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla 10 ml ultra saf su ve hemen ardından 50 ml çözgen (serbest aroma maddelerinde kullanılacak olan) geçirilerek C18'e bağlanmış olan serbest aroma maddeleri uzaklaştırılacaktır. C-18 tarafından tutulan bağlı aroma maddelerinin alınması için 50 ml metanol kullanılacaktır (Fernandez-Gonzalez ve Di Stefano, 2004). Bağlı aroma maddelerini içeren metanol laboratuvar tipi döner evaporatörde, vakum altında, 40 °C' de 1 ml kalıncaya kadar koyulaştırılacaktır. Daha sonra bu sıvı, tüpe alınacak, 40 °C 'lik su banyosunda azot gazı altında, içerdiği metanol çözgeni tamamen uçurulacaktır. Böylece, glikozit halde ekstrakt elde edilecektir. Glikozitlere bağlı aroma maddelerinin analizi, enzimatik yolla parçalanmayla serbest hale dönüştürüldükten sonra gaz kromatografisinde yapılacaktır (Günata, 1984; Günata ve ark., 1985;). Enzimatik parçalanmada DSM (Fransa)'den sağlanan "AR-2000" enzimi kullanılacak ve işlem şu şekilde gerçekleştirilecektir:

Glikozit haldeki ekstrakt üzerine 0.1 ml fosfat-sitrat tamponu (0.1M, pH:5) ve 0.1 ml fosfat-sitrat tamponunda 0.4 mg enzim çözündürülerek hazırlanacak olan 0.1 ml AR 2000 enzimi ilave edilecek ve tüpün ağzı hermetik olarak sıkıca kapatıldıktan sonra, 40 °C'de, 12-14 saat süre ile su banyosunda bırakılacaktır; enzimatik parçalanma tamamlandıktan sonra, tüp soğutulurken, tüp içeriği 100 µl çözgenle beş kez yıkanacak ve serbest hale geçen aroma maddeleri pentan/diklorometan çözümü alınacak; sonra, bu çözümü karışımı, küçük hacimli bir tüpe alınarak, içerisine iç standart olarak 40 µg 4-nonanol ilave edilecektir; daha sonra pentan/diklorometan, 37 °C'lik su banyosunda, geri soğutucu altında yaklaşık 40 µl kalıncaya kadar konsantre hale getirilecek ve bu haliyle doğrudan gaz kromatografisine enjekte edilerek, serbest hale getirilen bağlı aroma maddelerinin analizi yapılacaktır (Günata ve ark., 1985; Carro ve ark., 1996; Cabaroğlu ve ark., 1997; Lopez-Tamames ve ark., 1997).

GC-FID-MS Koşulları

Aroma maddelerinin miktarı ve tanımlanması "Agilent 6890N" marka gaz kromatografisi, buna bağlı "Agilent 5975B VL MSD" kütle spektrometresinde gerçekleştirilecektir.

Aroma maddelerinin miktar tayininde, "Agilent 6890N" marka alev iyonlaşma dedektörlü (FID) gaz kromatografisi kullanılacaktır. Aroma maddelerinin ayrımı DB-WAX kapiler kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) kullanılarak gerçekleştirilecektir. Enjektör sıcaklığı 220°C, dedektör sıcaklığı 250°C, kolon sıcaklığı ise 60°C'de 3 dakika beklemeden sonra, dakikada 2°C artarak 220°C'ye ve daha sonra dakikada 3°C artarak 245°C'ye çıkacak ve bu sıcaklıkta 20 dakika sabit kalacak şekilde programlanacaktır. Cihaza enjekte edilecek miktar 3µl'dir. Taşıyıcı gaz olarak He kullanılacaktır.. Helyumun akış hızı 3,3 ml/dk'dır. Dedektör ve enjektör sıcaklıkları 250°C'dir.

Aroma maddelerinin tanısında yukarıda belirtilen gaz kromatografisine bağlı "Agilent 5975B VL MSD" marka kütle spektrometresi kullanılacaktır. Enjektör tipi ve sıcaklık programı gaz kromatografisi ile aynı koşullardadır. Kütle spektrometresinin iyonlaşma enerjisi 70 eV, iyon kaynağı sıcaklığı 250°C, kuadrol sıcaklığı 120 °C tutularak, 1 saniye aralıklarla 29-350 kütle/yük (m/e) arasında tarama yapılacaktır. Piklerin tanısı, standardı bulunan bileşikler için standart çözelti enjekte edilerek, standardı olmayan bileşikler için kütle spektrumunun bilgisayar hafızasındaki kütle spektrumlarıyla karşılaştırılması yoluyla yapılacaktır. Piklerin tanısından sonra aroma maddelerinin konsantrasyonları iç standart yöntemiyle hesaplanacaktır (Schneider ve ark., 1998; 2001).

2.2.2.3. Koklama sonrası yoğunluk belirleme yöntemi ile GC-O profilinin belirlenmesi

Üzüm ve şarap örneklerinin GC-O profilinin oluşturulmasında Le Guen ve ark. (2000), Ferreira ve ark., (2003b), Campo ve ark. (2005) tarafından bildirilen koklama sonrası yoğunluk belirleme tekniği kullanılacaktır.

Ekstraktın Hazırlanması

üzüm ve şaraptaki aroma maddeleri bir yıkama-tutulma sistemi (purge-trap) ile dinamik tepe boşluğu (dynamic headspace)

tekniki uygulanarak ekstrakte edilecektir (Campo ve ark; 2005). Ekstraksiyonda 400 mg LiChrolut EN reçine içeren polipropilen SPE kartuş (iç çapı 0,8 cm, iç hacmi 3 ml) kullanılacaktır. Bu reçine, şaraptaki aroma maddelerini çok iyi ekstrakte edebildiği için seçilmiştir (Lopez ve ark., 2002). Kartuş 20 ml diklorometan ile yıkanır ve sonra havanın kartuş boyunca geçmesi sağlanarak kurutulur (-0,6 bar, 10 dakika). Şekil 5' de verilen cam düzenekte görüldüğü gibi cam kap içerisine 80 ml şarap örneği konulur ve kartuş cam kabın tepe kısmına yerleştirilir. Arkasından sistemden kontrollü bir şekilde azot gazı (500 ml/dakika) oda sıcaklığında 100 dakika boyunca geçirilir. Bu süreçte cam kabın tepe boşluğunda serbest kalan aroma maddeleri kartuş içerisindeki reçine tarafından tutulurlar. Daha sonra kartuştan 3,2 ml %5 metanol içeren diklorometan çözeltisi geçirilerek tutulan aroma maddeleri geri alınır. Sonra bu ekstrakt azot gazı akışı altında 200 µL' ye konsantre edilecektir.



Şekil 5. GC-O aroma ekstraksiyon düzeneği

GC-O Koşulları

Ekstrakte edilen örneklerin GC-Olfaktometri analizleri "Agilent 6890N" marka gaz kromatografisine bağlı "Gerstel ODP-2" marka olfaktometride gerçekleştirilecektir. Aroma maddelerinin ayrımı DB-WAX kapiler kolon 30m x 0.25mm x 0.5 µm kullanılarak gerçekleştirilecektir. Cihaza enjekte edilecek miktar 1 µl' dir. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılacaktır. He akış hızı 3,5 ml/dk' dır. Enjeksiyon bölünmesiz metotta ve enjektör sıcaklıkları 250°C'dir. Dedektör sıcaklığı 250°C' ye ve kolon sıcaklığı ise 40°C' de 5 dakika beklemeden sonra, dakikada 4°C artarak 100°C' ye ve daha sonra dakikada 6°C artarak 220°C' ye çıkacak ve bu sıcaklıkta 20 dakika sabit kalacak şekilde ayarlanacaktır.

Koklama İşlemi

Koklama işlemi eğitimli 6 panelist tarafından gerçekleştirilecektir. Koklama zamanı yaklaşık olarak her bir oturumda her bir panelist için 20 dakika tutulacaktır. Panelistler, yedi puanlık bir kategori skalası (yarım değerler dahil; 0 = algılanamadı; 1=zayıf, zor tanımlanabilir koku; 2 = temiz, fakat yoğun olmayan koku ve 3 = yoğun koku) kullanarak her bir kokunun genel yoğunluğunu değerlendirecektir. Bu tekniğin kantitatif yeterliliği Ferreira ve ark., (2003b) tarafından doğrulanmıştır.

Koklama sonrası verilen puanlar (algılama yoğunluğu ve sıklığı) kullanılarak % "Modifiye Frekans" değerleri hesaplanarak aroma aktif bileşikler (aroma profil) belirlenecektir. Modifiye frekans değeri $MF(\%) = \sqrt{F(\%)} \times I(\%)$ formülü kullanılarak hesaplanacaktır. Bu formülde F(%) aromatik bir özelliğin algılama frekansının yüzdesini ve I(%) ise maksimum yoğunluğun yüzdesi olarak belirlenen ortalama yoğunluğu ifade eder (Dravnieks; 1985). Daha sonra bu bileşikler kokuları, alıkonma indeksleri ve standartların MS spektrumları karşılaştırılarak tanımlanır.

2.2.2.4. Aroma maddelerinin miktarlarının hesaplanması

Piklerin tanısından sonra aroma maddelerinin miktarlarını hesaplamak için, standart bileşiklerden kalibrasyon eğrileri elde edilecek ve iç standart yöntemiyle aşağıdaki formül kullanılarak miktarlar hesaplanacaktır. Hesaplama her bir bileşiğin cevap faktörü dikkate alınacaktır.

$$C_i = (A_i / A_{st}) \times C_{st} \times RF \times HF$$

- C_i : Bileşiğin konsantrasyonu
 A_i : Bileşiğin pik alanı
 A_{st} : İç standartın pik alanı
 C_{st} : İç standartın konsantrasyonu (40 µg/100 ml)
RF : Cevap faktörü
HF : Hesaplama faktörü (örnek miktarının kg'a çevrilmesi için faktör: 10)

2.2.2.5. Fenol Bileşiklerinin HPLC ve LC-MS ile Analizi

Renksiz Fenol Bileşikleri Analizleri

Üzüm örneklerinden 20 gram alınarak üzerlerine 50 ml aseton/su (70/30; h/h) çözeltisi ilave edilecek azot gazı altında karıştırıcıda 30 dakika süresince ekstraksiyon yapılacaktır. Bu sürenin sonunda karışım süzülecektir. Süzme sırasında Whatman kağıdı (GF/F) kullanılacaktır. Daha sonra kabuk ve çekirdek üzerine yeniden 500 ml aseton/su çözeltisi eklenip, aynı işlemler tekrarlanacaktır. Ekstraksiyon işlemi üç kez tekrarlanacaktır. Ekstraksiyon işlemleri sonrasında elde edilen 3 ekstrakt karıştırılıp vakum altında konsantre hale getirilecektir (Bourzeix ve ark. 1986). Ekstratların saflaştırılması Sun ve ark. (1998)'nin yöntemine göre yapılacaktır HPLC'ye enjekte edilecektir.

Analizi yapılacak şıra/şaraptan 50 ml alınarak vakum altında konsantre hale getirilecektir. Daha sonra konsantre haldeki örnek üzerine sırasıyla 25 ml etil eter ve 25ml etil asetat ilave edilip sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılacaktır. Daha sonra elde edilen ekstraktlar karıştırılıp konsantre hale getirilecek ve HPLC'ye enjekte edilecektir.

Analizlerde kullanılacak HPLC koşulları şu şekildedir:

Kolon: C18 ODS (25 x 4.6 mm x 5µ)

Enjeksiyon miktarı: 20 µL

Taşıyıcı faz: A=Su/formik asit (95:5, h/h), B= Metil alkol/ Formik asit (95/5, h/h)

Akış hızı: 1ml/dak

Dalga boyu: 280 ve 320

Dedektör tipi: Diyot array dedektör

Fenol bileşiklerinin HPLC analizlerinde kullanılacak elusion sistemi şu şekildedir:

Süre (Dakika)	% A	% B
0	100	0
10	100	0
40	95	5
58	85	15
72	75	25
103	50	50
107	0	100
116	0	100
120	0	0

Fenol bileşiklerinin belirlenmesi, kullanılan standart maddelerin alıkonma zamanları ve spektrumları kıyaslanarak yapılacaktır. Standart olmayan bileşiklerin tanısında ise literatür verilerindeki alıkonma zamanları ve spektrumlarından yararlanılacaktır.

Fenol bileşiklerinin LC-MS ile tanımlanmasında Masslynx 4.0 paket programı ile çalışan Applied QTRAP 4000 marka sıvı kromatografisi kütle spektrometresi kullanılacaktır. Çalışma pozitif ve negatif iyon modunda yürütülecektir. Çalışmada kaynak sıcaklığı 120°C, azotun akış hızı 220 L/saat, azotun ekstraktı kurutma hızı 9 L/saat, kapiller voltaj 3.5 kV, iyonizasyon enerjisi 30, 60 ve 90 Ev olarak ayarlanacaktır. Çalışmada 50-2000 amu arasında kütle spektralleri kaydedilecektir (Jourdes, 2003).

2.2.2.6. Şeker ve Organik Asitlerin Analizi

Örneklerde şeker (glikoz ve früktoz) ve organik asit (tartarik, malik, laktik, asetik ve sitrik) analizleri HPLC ile yapılacaktır. Analiz için mekanik parçalayıcıda püre haline getirilmiş üzüm örneklerinden 0.5 g alınacak ve bunun üzerine 2.5 ml % 80'lik etil alkol ilave edilerek karıştırılacaktır. Karıştırma işleminden sonra örnekler santrifüj edilecek ve üstteki berrak kısım alınacaktır. Ekstraksiyon işlemi 3 defa tekrar edilecektir. Daha sonra etil alkol vakum altında döner evaporatör ile 45 °C'de uzaklaştırılacaktır. Örneğe demineralize su ilave edilecek, 0.45 µm gözenek çapındaki membran filtreden geçirilecek ve 20 µl örnek HPLC'ye enjekte edilecektir. Organik asit ve şekerlerin miktarlarının belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda dış standart çözeltileri hazırlanacak, HPLC'ye enjekte edilerek standart eğriler çıkarılacaktır (Rudnitskaya ve ark., 2006).

Organik asitlerin analizi, diode array dedektörlü (DAD) yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (Agilent 1100, ABD), LiChrosorb RP-18 kolon (10 m, 25 cm x 4.0 mm) (Merck, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilecektir. Taşıyıcı faz olarak 0.01 N H₃PO₄ kullanılacak ve akış hızı 0.3 ml/dakika olacaktır. Analizler 210 nm dalga boyunda yürütülecektir (Rudnitskaya ve ark., 2006). Şekerlerin analizi ise Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm) kolon kullanılarak refraktif indeks (RID) dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisinde gerçekleştirilecektir. Analizlerde, taşıyıcı faz olarak 0,045 N sülfürik asit çözeltisi kullanılarak izokritik olarak gerçekleştirilecektir. Çalışmada kullanılacak kolon fırını sıcaklığı 80°C olacaktır.

2.2.2.7. Duyusal Analizler

Denemelerde elde edilen şarapların duyusal analizlerinde lezzet profil testi uygulanacaktır. Duyusal analizler 7 kişilik eğitilmiş bir panelist grubu tarafından gerçekleştirilecektir (Lawless ve Heyman, 2010; Altuğ ve Elmacı, 2011).

2.2.2.8. Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiksel analizler

Veriler çok değişkenli istatistiksel analiz yöntemleri kullanılarak analiz edilecektir. Yöre özelliklerinin kalite parametreleri üzerine etkilerini kıyaslamak amacıyla diskriminant ve kümeleme analizleri yapılacak ve şarap kalitesini ifade eden bileşim özellikleri esas alınarak gruplar belirlenecektir. Gruplama değişkenleri olarak aroma, fenol ve organik asit bileşiklerinin konsantrasyonları kullanılacaktır. Böylece diskriminant analizi ile farklılık yaratan veriler yani markörler belirlenecektir. Bu belirlenecek markörler ile GC-O ve duyusal analiz sonucunda varyans analizi ile önemli bulunan tanımlayıcılar arasında PLRS-partial Least Squares Regresyon (kısmi en küçük kareler regresyonu) analizi uygulanacaktır. Bu regresyon analizi sonucu duyusal tanımlayıcılar ile markörler arasında nicel olarak bir ilişki ortaya konmaya çalışılacaktır.

Ayrıca, elde edilecek verilere bağımsız değişkenlerin etkisini incelemek amacıyla iki- yönlü mü varyans analizi (two-way ANOVA) uygulanacak ve önemli bulunan farklılıklara Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanacaktır. Bu amaçla "Windows SPSS 18 Software" paket programı kullanılacaktır. (Lawless ve Heyman, 2010).

Veteriner Çalışma Alanı Örneği:

A. KKKAH'a karşı geliştirilmiş hücre kültür tabanlı inaktif aşıya bağlı oluşacak olan hücresel immun yanıtın



belirlenmesinde gerekli olan ve T hücrelerini spesifik olarak aktive eden KKKAH Kelkit06 suşunun NP ve Gn proteinlerindeki immunodominant bölgelerin identifiye edilmesi.

A1. Sentetik Peptit Tasarımı

Sentetik peptit dizaynı KKKAH Kelkit06 suşunun tam büyüklükteki NP ve Gn proteinlerinin aminoasit dizisi baz alınarak sentez edilecektir (Özdarendeli ve ark., 2010).

KKKAH Kelkit06 NP proteini için; EMBL/GenBank veri tabanında ACT88366 koduyla yer alan 1-482 aminoasit dizisi baz alınarak peptit tasarımı yapılacaktır.

KKKAH Kelkit06 Gn proteini için; EMBL/GenBank veri tabanında ACT88367 koduyla yer alan 523-807 aminoasit dizisi baz alınacaktır. EMBL/GenBank veri tabanında ACT88367 koduyla yer alan aminoasit dizisi, tam büyüklükteki PreGn proteine (1-1688) ait aminoasit dizisidir. PreGn prekürsör proteini çeşitli proteazlar tarafından kesilerek farklı glikoproteinlerin oluştuğu bilinmektedir. Virionun yapısına giren Gn glikoproteininin 523-807 aminoasitleri arasında olduğu düşünüldüğü için bu bölge seçilmiştir.

Her bir peptit 15 aminoasitten oluşacak ve takip eden her peptit ile 11 aminoasidi örtüşecek (overlap) şekilde dizayn edilecektir. KKKAH Kelkit06 NP proteini için 118 peptit, Gn proteini için 69 peptit sentez edilecektir.

Her bir peptit havuzu 10 adet bireysel peptitten oluşacaktır.

Her bir peptit 4 mg/ml konsantrasyonda dimetilsülfoksit (DMSO) ile sulandırılarak +4°C'de saklanacaktır.

A2. KKKAH İnaktif Aşısının Hazırlanması

A2.1. Aşı Antijen Üretimi: Bu amaçla, 5×10^6 adet Vero E6 hücrelerinin 20 ml hücre üretme vasatı içerisinde 175 cm² flaska pasajlanmasından 16 saat sonra 0.01 MOI KKKAH Kelkit06 suşu ile adsorbsiyona bağlı yöntem ile ekim yapılacaktır (Berber ve ark., 2013). 37°C'de 5% CO₂ inkübatörde flasklara 1 saat inkubasyon sonrası 20 ml virüs üretme vasatı (%2 FBS, %1 antibiyotik kokteyli, DMEM F-12) eklenecektir. Enfeksiyondan sonraki 3. gün hücre kültür flaskları alınarak kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilecektir.

A2.2. Aşı Antijeninin Konsantre Edilmesi

Virüs içeren üst sıvı +4°C'de 3000 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüj edilerek hücre parçaları uzaklaştırıldıktan sonra, cam balon jöjelere alınan 200 ml vasat hacminin %15'i kadar olan %23 NaCl'den 30 ml, 230 ml olan final hacmin %10'u kadar PEG8000'den 23 ml yavaşça ilave edildikten sonra +4°C'de 16 saat süreyle 100 rpm'de karıştırılacaktır. SW28 ultrasantrifüj tüplere 38 ml paylaştırılmasını takiben PEG karışımı ultrasantrifüj'de +4°C'de 12500 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüj edilecektir. Üst sıvı alındıktan sonra oluşan pelet 500 µl 1X PBS ile süsbanse edilecek ve +4°C'de 5500 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra oluşan üst sıvı SW 41 tüplerde 12 ml'ye PBS ile tamamlanarak +4°C'de 24000 rpm'de 2 saat süreyle ultrasantrifüj edilecektir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml PBS ile pelet kırılmadan çözündürülecektir. Lowry deneyi ile protein miktarı belirlendikten sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilecektir.

A2.3. Aşı Antijeninin Safılaştırılması

A2.3.1. Sükroz Gradient Ultrasantrifügasyon

%20, %30, %40, %50 ve %60 w/w oranlarında hazırlanacak sükroz solüsyonları 2 ml tabakalar halinde SW-41 ultrasantrifüj tüpünün kenarından yavaşça peristaltik pompa ile 1 rpm hızda 21 G iğne kullanılarak ilave edilecektir. Oda ısısında 3 saat bekletildikten sonra konsantre edilmiş virüs süspansiyonu 1ml miktarında gradient tabakaların en üstüne yavaşça ilave edilerek 24000 rpm hızda +4°C'de 18 saat santrifüj edilecektir.

A2.3.2. Fraksiyonların Ayrılması

Fraksiyonların ayrılması işlemi, peristaltik pompaya bağlı gradient kollektör ile yapılacaktır. 10 cm büyüklüğündeki iğne SW 41 tüpünün ortasından tüpün en altına ulaşıncaya kadar gradientleri bozmadan nazikçe daldırılacak ve 21 G iğne bulunan uç ise kollektör cihazına takılarak kollektörün gövdesinde yer alan boşluklara 1,5 ml santrifüj tüpler yerleştirilecek ve peristaltik pompa 3 rpm hızda çalıştırılarak fraksiyonlar işaretli her bir tüpe 1ml miktarında toplanacaktır. Alınan fraksiyonlar western blot ile test edilene kadar +4°C'de saklanacaktır.

A2.3.3. SDS-PAGE ve Western Blotlama

Her bir fraksiyona ait örnekler SDS-PAGE jelde yürütülecek ve proteinler naylon membrana transfer edilecektir.

Daha sonra %5 yağsız süt tozunda 30 dakika bloklama işlemi uygulanacaktır. 1/2000 oranında 10 ml %5 yağsız süt tozunda hazırlanan anti-KKKAH poliklonal fare serumu (Çanakoğlu ve ark., 2013) 1 saat oda ısısında 90 rpm'de çalkalayıcıda inkübe edilecektir. Yıkama işlemlerinden sonra konjugat (tavşan anti-fare HRP) ile inkübe edildikten sonra ve görüntüleme solusyonu ilave edilerek 5 dakika süreyle membranla muamele edilecektir. Membran görüntüleme kasetine yerleştirildikten sonra karanlık bir odada film ile 5 dakika bekletilecektir. Film geliştirme solüsyonunda inkubasyonu takiben, fiksör solüsyonunda da bir süre bekletilecek ve filmin gelişmesi sağlanacaktır. Western blot testinde virüse ait proteinlerin yoğun olarak bulunduğu fraksiyonlar tespit edilecek diğer fraksiyonlar ise atılacaktır. Böylece viral antijen kısmı olarak saflaştırılmış olacaktır. Virüse ait proteinlerin yoğun olarak bulunduğu fraksiyonlar bir araya getirilerek SW 41 tüplerde 12 ml'ye PBS ile tamamlanarak +4°C'de 24000 rpm'de 2 saat süreyle ultrasantrifüj edilecektir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan pelet sonra 0.5 ml PBS ile süspanse edilecektir. Lowry deneyi ile protein miktarı belirlendikten sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilecektir.

A2.4. Aşı antijenin İnaktivasyon ve Adjuvanizasyonu

Virüs inaktivasyonu, %37 formaldehit stoğu kullanılarak %0.05 konsantrasyona getirilecek olan formaldehidin eklenmesiyle oda ısısında 3 gün bekletilerek yapılacaktır. Formaldehit ve sodyum bisülfat kalıntılarını uzaklaştırmak için 20.000 MWCO diyaliz kaseti kullanılacaktır. Kaset PBS içerisine daldırılıp oda ısısında 2 saat aralıklarla en az 4 kez PBS değiştirilecek ve son olarak bir gece oda ısısında PBS'ye karşı diyaliz edilecektir. İnaktive aşı antijeni, kasetlerden alınarak Lowry testi ile protein miktarı ölçülüp -20°C'de saklanacaktır. Bu şekilde saflaştırılan ve inaktive edilen aşı antijeni kullanılmadan hemen önce alimunyum hidroksit ile adjuvanize edilerek kullanıma hazır hale getirilecektir.

A3. Aşı Grubunun Oluşturulması ve İmmünizasyon Takvimi

KKKAH karşı geliştirilmiş hücre kültür tabanlı inaktif aşıya bağlı oluşacak olan hücresel immün yanıtın belirlenmesinde gerekli olan ve T hücrelerini spesifik olarak aktive eden immunodominant bölgelerin (KKKAH Kelkit06 suşunun tam büyüklükteki nükleoproteini ile glikoprotein Gn) tanımlanması amacıyla 6-8 haftalık 20 adet dişi Balb/c fareleri kullanılacaktır. Balb/c farelerinden 15 adedi aşı grubu 5 adedi kontrol grubu olarak planlanmıştır. Aşı grubundaki Balb/c farelerine 10 µgr antijen içeren ve alimunyum hidroksit ile adjuvanize edilmiş KKKAH inaktif aşısı 0, 21 ve 42. günlerde intraperitoneal olarak verilecektir. Kontrol grubunda bulunan her bir fareye 0, 21 ve 42. günlerde intraperitoneal olarak 500 µgr dozunda alimunyum hidroksit verilecektir.

A4. Enzime Bağlı Immunosorbent Spot (ELISPOT) Testi

Bu çalışmada fare IFN-γ ELISPOT kiti kullanılacaktır. Son immunizasyondan 2 hafta sonra aşı grubu ve kontrol grubunda bulunan fareler servikal dislokasyonla öldürülecek ve steril ortamda dalak hücreleri hazırlanacaktır (her gün ortalama 2-3 fare olmak üzere bu işlem 10-15 gün içerisinde tamamlanacaktır). Bu arada peptit havuzları hazırlanacaktır. Her bir peptit havuzu 10 peptit içerecek ve her bir peptidin final konsantrasyonu 10 µg/ml olacaktır. Böylece, NP için toplam 118 peptit havuzu Gn için toplam 69 peptit havuzu oluşturulmuş olacaktır.

ELISPOT plakları her bir kuyucuğa 100 µl PBS'te uygun konsantrasyonda dilüe edilmiş ve kit içeriğinde bulunan yakalama (capture) antikoru eklenerek 16 saat 4 °C'de inkübe edilecektir. Yıkama işleminin ardından, kuyucuklar 200 µl %10 Fötal Bovine Serum (FBS) içeren bloklama solusyonu ile 2 saat oda sıcaklığında bloklanacaktır. Aşı ve kontrol grubu farelerden elde edilen dalak hücreleri tek hücre süspansiyonu haline getirilecek ve aşı ve kontrol grubu farelerden elde edilen dalak hücreleri tek hücre süspansiyonu haline getirilecek ve ELISPOT plaklarındaki her bir kuyucuğa alyuvarlar parçalandıktan sonra 2×10^5 hücre olacak şekilde bırakılacaktır. Negatif kontrol olarak 4 kuyucuğa sadece kültür süspansiyonu (DMEM, 10% FBS, 5% HEPES tamponu, 2% L-glutamine, 1% penisilin/streptomisin) pozitif kontrol olarak ise 2 µg/ml pürifiye phytohemagglutinin solusyonundan 200 µl 4 kuyucuğa eklenecektir. Her bir peptidin final konsantrasyonu 10 µg/ml olan peptit havuzlarından 200 µl kuyucuklara ilave edilecektir. Her bir peptit havuzu, ELISPOT plaklarındaki 3 kuyucuğa olacak ilave edilecektir (triplicate). Daha sonra, 48 saat 37°C, %5 CO2 ortamında inkübe edilecektir. Kuyucukların, 2 kere 5 dakika deionize su ile yıkanmasının ardından her bir kuyucuk 200 µl %0.05 Tween içeren PBS ile 3 kez yıkanacaktır. Kit içeriğinde bulunan biotinle işaretlenmiş deteksiyon antikoru 100 µl miktarında kuyucuklara eklenecek ve 2 saat oda sıcaklığında bekletilecektir. Sonrasında 200 µl %0.05 Tween içeren PBS ile 3 kez yıkanacak ve her bir kuyucuğa konjugat (streptavidin-HRP) eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra 4 kez Tween içeren PBS ile 2 kez de sadece PBS ile yıkanacaktır. Kit içeriğinde olan AEC substratı her bir kuyucuğa 100 µl miktarında eklenmesinin ardından 5-60 dakika içerisinde gelişecek spotlar ELISPOT okuyucuda (AID Elispot

Reader) okunacaktır. Sonuçlar, spot oluşturan hücreler/kuyucuk şeklinde ifade edilecektir. Negatif kontrol kuyucuklarından (kültür süsbansiyonu) 4 kat daha fazla spot olan kuyucuklar pozitif kabul edilecektir. Ayrıca kontrol grubundan (sadece adjuvant verilen fare grubu) elde edilen sonuçlar, aşı grubundan elde edilen sonuçların normalizasyonda kullanılacaktır.

A5. İmmunodominant Olduğu Belirlenen Peptit Havuzlarını Oluşturan Her Bir Peptidin ELISPOT Testi ile Belirlenmesi

ELISPOT testi ile immunodominant olduğu belirlenen 5 adet NP ve 5 adet Gn olmak üzere toplam 10 peptit havuzu seçilecektir. Her bir peptit havuzu toplam 10 peptitten oluştuğu için 100 adet peptidin immunodominant olup olmadığı ELISPOT ile belirlenecektir. Bu amaçla, 6-8 haftalık 15 adet dişi Balb/c fareleri kullanılacaktır. Balb/c farelerinden 10 adedi aşı grubu 5 adedi kontrol grup olarak planlanmıştır. Aşı grubundaki Balb/c farelerine 10 µgr antijen içeren ve alimunyum hidroksit ile adjuvanize edilmiş KKKAH inaktif aşısı 0, 21 ve 42. günlerde intraperitoneal olarak verilecektir. Kontrol grubunda bulunan her bir fareye 0, 21 ve 42. günlerde intraperitoneal olarak 500 µgr dozunda alimunyum hidroksit verilecektir. Yöntem bölümünün 6.4. kısmında detaylı olarak açıklandığı gibi, ELISPOT testi ile peptitler bireysel olarak tespit edilecektir. Test sonucu NP'ye karşı en yüksek pozitiflik veren 1 adet peptit ve Gn karşı en yüksek pozitiflik veren 1 adet peptit belirlenmiş olacaktır. Belirlenen bu peptitler aşı doz çalışmalarında yapılacak olan deneylerde (ELISPOT, Akım sitometrisi ve Sitokin ELISA) T hücrelerinin stimülasyonunda kullanılacaktır.

B. Hücre Tabanlı KKKAH İnaktif Aşısına Karşı Oluşacak Hücresel ve Humoral İmmun Yanıtın Araştırılması

B1. Aşı Doz ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması, İmmünizasyon Takvimi ve Örneklerin Alınması

Bu amaçla, 3 farklı doz grubu ve 1 kontrol grubu oluşturulacaktır. Düşük doz grubuna verilecek aşı 5 µgr antijen içerirken orta doz grubu 10 µgr ve yüksek doz grubu 20 µgr antijen içerecektir. Aşı ve kontrol gruplarının her birisi 7 adet 6-8 haftalık dişi Balb/c faresinden oluşacaktır. Aşı doz grubundaki farelere, KKKAH inaktif aşısı 0, 21 ve 42. günlerde intraperitoneal olarak verilecektir. Her bir doz grubu immunizasyonları arasında en az 15 günlük boşluk olması planlanmaktadır. Kontrol grubunda bulunan her bir fareye 0, 21 ve 42. günlerde intraperitoneal olarak 500 µgr dozunda alimunyum hidroksit verilecektir. İmmünizasyon öncesi retroorbital yolla bütün hayvanlardan kan alınacaktır. Humoral yanıtın (antikor ELISA ve nötralizasyon testleri) belirlenmesi amacıyla 7, 15, 21, 35, 42 ve 56. günlerde aynı şekilde bütün hayvanlardan kan serumu alınacaktır. Alınan kan serumları 56°C'de 30 dakika inaktive edilecek ve kullanıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilecektir. Son immunizasyondan 2 hafta sonra fareler servikal dislokasyonla öldürülecek ve steril ortamda hazırlanan dalak hücrelerinin bir kısmı ELISPOT testinde bir kısmı ise akım sitometrisinde kullanılacaktır. Ayrıca peptitlerle stimüle edilen dalak hücrelerinin kültür sıvıları sitokin ELISA testi için muhafaza edilecektir.

B2. Humoral İmmun Yanıtın Belirlenmesi

B2.1 İndirekt ELISA Testi ile Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi

Aşı antijeni hazırlanması bölümünde detaylı anlatıldığı üzere, KKKAH Kelkit06 suşu, Vero E6 hücrelerinde üretilip konsantre edildikten sonra süroz gradient ultrasantrifügasyon yöntemiyle kısmi pürifiye edilecektir. İnaktivasyon işleminden sonra dializ edilecek olan KKKAH antijenleri ELISA pleytlerindeki her bir kuyucuğa 200 ngr miktarında pH 9.6 karbonat tampon solüsyonu kullanılarak 1 gece + 4°C'de bağlanacaktır. %0,05 PBS-Tween 20 içerisinde hazırlanmış %5'lik süt tozu ile bloklama işlemi yapıldıktan sonra yöntem (B1) kısmında belirtilen zamanlarda alınan fare kan serumlarının 1/50'den başlanarak log 2 tabanında bloklama solüsyonu içerisinde seri sulandırılmaları yapılacak ve 1 saat 37°C' de inkübe edilecektir. Yıkama işlemlerini takiben tavşan anti-fare konjugatı her bir kuyucuğa eklenecek ve 1 saat 37 °C' de inkübe edilecektir. Yıkama işlemlerini takiben görüntüleme amacıyla 3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine tableti 4 ml 0,1 M sitrik asit ve 6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ içerisinde çözülürölerek ve 100 µl H₂O₂ ilave edilecektir. Hazırlanan substrat solüsyonu her bir kuyucuğa ve 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra durdurma solüsyonu (0,2 N sülfirik asit) ilave edilerek ELISA pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda okunarak sonuçlar elde edilecektir. Deneyde daha önce pozitif ve negatif olduğu tespit edilen fare serumları pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılacaktır.

B2.2. Aşılama Sonrası Doz Gruplarındaki Koruyucu Antikor Titrelelerinin Belirlenmesi

Bu amaçla grubumuz tarafından 108G126 nolu proje kapsamında geliştirilen pseudo-plak redüksiyon nötralizasyon testi (PPRNT) uygulanacaktır (Çanakoğlu ve ark., 2013). Kısaca, son immunizasyondan 2 hafta sonra alınacak fare kan serumlarının koruyucu antikor titreleri belirlenecektir. Serumlar 56°C'de 30 dakika inaktive edildikten sonra log 2 tabanında 1/2'den başlanarak 1/512'ye kadar serumlar sulandırılarak her bir serum sulandırmasına titresi bilinen (Berber ve ark., 2013) ve 50

pseudo-plak forming ünitesindeki KKKAH Kelkit06 virüsü eklenecektir. Karışım, +4°C'de 16 saat inkube edilecektir. Bir gün önceden Vero E6 hücresi ekilen 96 kuyucuklu hücre kültür pleytlerine serum virüs karışımları her kuyucuğa 50 µl ve her sulandırmadan 3'erli olmak üzere bırakılacak ve 1 saat 37°C'de inkübe edilecektir. İnokulum atıldıktan sonra %1 karboksil metil selüloz (%2 karboksil metil selüloz 2X yoğunlukta hazırlanan DMEM F-12 ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra %3 FBS ve %1 antibiyotik ilave edilerek elde edilmektedir) solusyonundan her kuyucuğa 1ml eklenecek ve pleyt 37°C %5 CO₂ inkübatörde 3 gün inkube edilecektir. Daha sonra %10 nötral buffer formalin ile fikse edilecek ve yıkama işlemlerinden sonra permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dakika muamele edilecektir. PBS içinde hazırlanan %5 yağsız süt tozuyla 1 saat blokama işleminden sonra 1/1500 oranında sulandırılan anti-KKKAH poliklonal fare serumu her bir kuyucuğa ilave edilecek ve 1 saat oda ısısında inkube edilecektir. Yıkama işlemlerinden sonra 1/1500 oranında sulandırılan keçi anti-fare β-gal konjugatı 1 saat süreyle oda ısısında 50 rpm hızda çalkalayıcıda inkube edilecektir. Yıkama işlemlerini takiben substrat solüsyonundan (5mM MgCl₂ %99 dimetilformamid ile 50mg/ml olarak hazırlanmış X-Gal ve 70% dimetilformamid ile 83 mg/ml olarak hazırlanmış NBT) 0.2 ml her kuyucuğa ilave edildikten sonra 37°C inkübatörde 15-30 dakika arasında bekletilecektir. Mikropleytlar mikroskop altında incelenecek ve direk olarak >50 redüksiyon sağlayan sulandırmalar temel alınarak nötralize edici anti-KKKAH antikor titresi belirlenecektir.

B3. Hücresel İmmün Yanıtın Belirlenmesi

B3.1. Aşılama Sonrası Doz Gruplarındaki IFN-γ Yanıtının ELISPOT Testi ile Belirlenmesi

ELISPOT testi ile immunodominant olduğu belirlenen NP spesifik 1 peptit ve Gn spesifik 1 peptit kullanılacaktır. Test, yöntem bölümünün A4 kısmında detaylı açıklandığı gibi gerçekleştirilecektir.

B3.2. Akım Sitometrisi

İnaktif KKKAH aşısına karşı oluşan IFN-gama'nın hangi düzeyde yardımcı T hücreleri (CD4) ve sitotoksik T hücreleri (CD8) tarafından üretildiği belirlenecek ayrıca total T hücre (CD3) sayısı akım sitometri ile belirlenecektir. Kısaca, son immunizasyondan 2 hafta sonra aşı grubu ve kontrol grubunda bulunan fareler servikal dislokasyonla öldürülecek ve steril ortamda dalak hücreleri hazırlanacaktır. Bu çalışmada BD Biosciences'tan alınacak antikorlar kullanılacaktır. En son aşılardan 2 hafta sonra farelerden alınan dalaklar steril ortamda tek hücre halinde suspanse edilerek, kültür vasatında (DMEM, 10% FBS, 5% HEPES tamponu, 2% L-glutamine, 1% penisilin/streptomisin) yıkanarak, 6 kuyucuklu hücre kültür pleytlerinde 37°C, %5 CO₂ ortamında inkube edilecektir. Her bir kuyucukta bulunan 5 milyon hücre (alyuvarlar parçalanacaktır ve bu sayıya dahil değildir) ELISPOT deneyi ile immunodominant olduğu belirlenen 1 adet NP spesifik ve 1 adet Gn spesifik peptitlerle ayrı ayrı uyarılarak 24 saat boyunca kültüre edilecektir. Sonrasında hücre içi boyamada kullanılan salgılamayı engelleyerek hücre içinde sitokin birikmesini sağlayan Brefeldin-A eklenerek, 6 saat daha inkübasyon devam edecektir. Aynı koşullarda antijenle uyarılmamış kontroller de olacaktır. Hücreler sayılacak ve akım sitometrisi boyama solüsyonuyla (PBS + 10% FBS + 0.09 Sodyum Azide) yıkanarak, 2x10⁷ hücre/ml olacak şekilde resüsbanse edilecektir. 50-100 µl hücre süspansiyonuna önce 1 µl Fc reseptör bloke edici antikor eklenerek 4°C'de 15 dakika inkübasyondan sonra membrandaki antijenlere spesifik konjuge antikorlar eklenecek (anti-fare CD3-FITC, anti-fare CD4-PE, anti-fare CD8-PE) ve 30 dakika daha inkübe edilecektir. Hücre içi boyama için 2 ml FACS lysing solüsyon kullanılacaktır. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından 5 dakika 500 g'de santrifüj edilerek üst sıvı atılacaktır. 500 µl 1X FACS permeabilizing solüsyon eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilecektir. 3 ml boyama solüsyonun eklenmesini takiben 5 dakika 500 g'de santrifüj edilerek üst sıvı atılacaktır. 100 µl boyama solüsyonu ve uygun konsantrasyonda anti-fare interferon-gama-FITC eklenerek, 30 dakika karanlıkta inkübe edilecektir. 3 ml boyama solüsyonun eklenmesini takiben 5 dakika 500 g'de santrifüj edilerek üst sıvı atılacaktır. 500 µl %1 paraformaldehit içeren PBS ile hücreler fikse edilecektir. Sonuçlar, BD Accuri C6 Akım Sitometri cihazı kullanılarak elde edilecektir. T lenfosit tiplerinin aktivasyonunun belirlenmesi için aşağıda verilen ikili antikor kombinasyonları kullanılacaktır.

- 1- CD3-FITC (veya CD3-PerCP) + CD4-PE kombinasyonu T lenfosit/Yardımcı T lenfosit oranının belirlenmesinde,
- 2- CD3-FITC (veya CD3-PerCP) + CD8-PE kombinasyonu T lenfosit/Sitotoksik T lenfosit oranının belirlenmesinde,
- 3- CD3-PerCP + IFN-γ-FITC kombinasyonu IFN-gama üreten T lenfositlerinin belirlenmesinde,
- 4- CD8-PE + IFN-γ-FITC kombinasyonu IFN-gama üreten sitotoksik T lenfositlerinin belirlenmesinde,
- 5- CD4-PE + IFN-γ-FITC kombinasyonu IFN-gama üreten yardımcı T lenfositlerinin belirlenmesinde.

B3.3. Sitokin ELISA



Yöntem kısmında daha önce anlatıldığı üzere, ELISPOT ve akım sitometrisi için hazırlanan ve her bir peptit (1 adet NP ve 1 adet Gn spesifik) ile ayrı ayrı stimüle edilen dalak hücrelerinin üst sıvıları alınarak aşı doz gruplarında, IFN-gama, TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-5 ve IL-10 düzeyleri ticari ELISA kitleriyle belirlenecektir. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ELISA testi gerçekleştirilecektir.

Su Ürünleri Çalışma Alanı Örneği:

Güvenlik önlemleri:

Aşının yapımı ve ilk aşı denemelerinde, mutant bakterilerin ve mutant olmayan bakterilerin çevreye ve diğer canlılara bulaşmasını önlemek için yüksek güvenlik önlemleri alınacaktır. *aroC* mutant bakterilerin yapımı, KTÜ, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi bünyesinde bulunan biyogüvenlik seviye 2 moleküler biyoloji laboratuvarında (BS2L) yapılacaktır. Aşılama çalışmaları da yine aynı Fakültede bulunan, su girişi ve çıkışı tamamen kontrol altında olan, kapalı, klimalı ve atık suların UV'den geçirildikten sonra doğaya bırakılacağı hem tatlı suyun hem de deniz suyunun bağlı bulunduğu akuatik toksikoloji laboratuvarında yapılacaktır. Böylece doğaya bırakılan atık sularda bulunan mikroorganizma sayısı %99.9 oranında azaltılmış olacaktır.

Kısaca yapılacak bütün işlemler kontrol altında ki laboratuvarlarda yapılacak ve akvaryumlardan çıkan sular UV'den geçirildikten sonra doğaya bırakılacaktır. Aşının güvenliği laboratuvarında test edildikten sonra saha denemeleri balık çiftliklerinde yapılacaktır. Saha denemeleri için yasal izin Tarım ve Köy İşleri Bakanlığından alınmıştır (Ekteki yasal izin belgesine bakınız).

1. *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* bakterilerinin *aroA* ve *aroC* geninin mutasyona uğratılması:

1.1. Bakteri suşları ve besi yeri:

Proje yöneticisinin DPT projesini yürütürken izole ettiği virulent *Y. ruckeri* RB0708 ve *L. anguillarum* LMG10861 suşları mutant atenué aşı yapmak için kullanılacaktır. Konjugasyon işleminde donör olarak *Escherichia coli* C118λpir suşu kullanılacaktır. *E. coli* Luria-Bertani (LB) broth ve katı agar besi yerinde 37°C'de ve *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* ise brain heart infusion (BHI) broth, BHI agar ve marine agarda (MA) 22°C'de çoğaltılacaklardır. Besi yerlerindeki seçiciliği ve konjugasyonu belirlemek için colistin (12,5 µg/ml) ve chloramphenicol (30 µg/ml) besi yerine ekleneceklerdir.

1.2. Mutant bakterin elde edilmesi:

Y. ruckeri ATCC 29473'ün taslak genom'u tamamlanmış ve *L. anguillarum* 775'in taslak genom'u ise tamamlanmak üzeredir. Tamamlanmak üzere olan *L. anguillarum*'ün *aroA*, *aroB*, *aroC*, *aroD* ve *aroE* gen sekansının ekibimize verileceğine dair destek mektubu ektedir.

- *Y. ruckeri* ATCC 29473: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&list_uids=29769
- *L. anguillarum* 775: <http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/211557.html>

L. anguillarum genom projesini yürütmekte olan Dr. Jorge H. Crosa (Oregon Health and Science University) ile temasa geçmiş ve Dr. Crosa ile *L. anguillarum* *aro* gen sekanslarına erişim konusunda anlaşma sağlanmıştır. . Dolayısı ile bu iki bakterilerin *aroA*, *aroC* ve diğer *aro* genlerine ulaşım konusunda hiçbir sorun yaşanmayacaktır. Bu genom sekansları kullanılarak mutant genler overlap uzatma yöntemiyle (Horton vd., 1989) elde edilecektir. Kısaca açıklamak gerekirse *aroA* ve *aroC* genlerinin başlangıç kodonundan 100 baz çifti (bp) aşağıdan (genin içine doğru) ve 1000 bp yukarıdan iki primer (*aroA*-R01 ve *aroA*-F01-1000; *aroC*-R01 ve *aroC*-F01-1000) ve yine bu genlerin bitiş kodonundan 100 bp yukarıdan (genin içine doğru) ve 1000 bp aşağısından olmak üzere iki primer (*aroA*-F01 ve *aroA*-R01-1000; *aroC*-F01 ve *aroC*-R01-1000) dizayn edilecektir. Her bir gen için 4 primer olacak (örnek, *aroA*-R01, *aroA*-F01-1000, *aroA*-F01 ve *aroA*-R01-1000) ve bu primerlerden üst gen içi primerinin sonuna (örnek, *aroA*-R01'in sonuna) alt gen içi primerinin sekansı (örnek, *aroA*-F01 primerinin sekansı) komplement olacak şekilde eklenecektir. Ayrıca bütün primerlerin sonuna, plazmid klonlamasında kullanılmak üzere *Xba*I restriksiyon enzimi sekansları (aaTCTAGA) eklenecektir. Baştaki iki a enzimin DNA'yı daha verimli kesmesi için eklenmektedir.

Bu primerlerden ikisi (örnek, *aroA*-R01 ve *aroA*-F01-1000) genin üst parçasını, diğer ikisinde (örnek, *aroA*-F01 ve *aroA*-R01-1000) genin alt parçasını amplifike etmekte kullanılacaktır. Amplifike edilen bu fragmentler belli oranlarda karıştırılarak bir sonraki overlap uzatma (extension) PZR'da template olarak kullanılacak böylece genin ortası elimine edilmiş olacaktır. Komplemetasyonda kullanılacak wild tip genler ise en üst (örnek, *aroA*-F01-1000) ve en alt (örnek, *aroA*-R01-1000) primerler kullanılarak elde edilecektir.

1.3. PZR şartları:

PZR de template olarak kullanılacak bakteriyel DNA fenol kloroform yada bir ticari kitler yardımıyla izole edilecektir (Altinok vd., 2008). Her bir PZR reaksiyonu 25 µL den oluşacak olup içerisinde 2,5 µL PZR bufer'i (10X), 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP, her primerden 0,4 mM, 0,5 U *pfu* DNA polimeraz ve 100 ng genomik DNA bulunacaktır. Reaksiyon toplamda 30 döngüde tamamlanacak olup döngüler 94°C'de 45 saniye denaturasyon, 56°C'de 30 saniye tutunma ve 72°C'de 2 dakika uzama şeklinde gerçekleştirilecektir. PZR uzatma suresi amplifike edilecek fragmentin büyüklüğüne göre 2 ila 4 dakika arasında değişecektir. Reaksiyon ilk döngüye başlamadan önce 94°C de 5 dakika ve son döngüden sonrada 72°C de 10 dakika bekletilecektir. Elde edilen ürünler %1'lik agarozda yürütüldükten sonra görüntülenecektir. Belirtilen PZR yöntemi overlap PZR içinde kullanılacak fakat bu aşamada template olarak bir önceki aşamada üretilen üst ve alt DNA fragmentleri kullanılacaktır.

1.4. *aroA* ve *aroC* geninin klonlanması ve *E. coli*'ye aktarılması:

PZR ile elde edilen mutant genler agaroz jelde yürütülüp, büyüklüklerinin belirlenmesiyle PZR işleminin başarısı onaylanacaktır. Elde edilen mutan ve wild tip genler uygun PZR temizleme kitleri (örnek, QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) ile



temizlendikten sonra *Xba*I enzimiyle kesilecektir. Genlerin klonlanacağı suicide vektör pDS142 de, *Xba*I enzimiyle kesilecektir ve kesim yerlerinden fosfatlar Shrimp Alkaline Fosfatase (SAP) yardımı ile uzaklaştırılacaktır. Bu aşama, kesilen vektörün bir sonraki aşamada kendi kendine ligate olmaması ve klonlamanın verimliliğinin artması açısından önemlidir. Son olarak *Xba*I enzimiyle kesilen normal ve mutasyona uğramış genler ve plazmid, kit kullanılarak yada agaroz jelde yürütülerek temizlenecek ve klonlama T4 Ligaz yardımı ile tamamlanacaktır.

Ligasyon reaksiyonundan 1-2 µl, elektroporasyon yöntemiyle *E. coli* C118λpir'e 2.5 kV, 25 µF ve 400Ω akımı kullanılarak transfer edilecektir (Karsi ve Lawrence, 2007). Elektropor yapılan hücreler içerisinde chloramphenicol (Cm) bulunan luria sıvı kültüründe 1 saat büyütüldükten sonra luria Cm içeren agara eklenecek ve 37°C'de 24 saat inkübe edilecektir. Besi yerinde çoğalan Cm-dirençli kolonilerden 10 kadarı bir gece luria sıvı ortamında büyütülüp, içerdiği plazmid saflaştırılacak ve hızlı tarama ve sekans prosedürleriyle klonlama yapılan rekombinant suicide vektörün doğru fragmentleri içerip içermediği kontrol edilecektir. Doğru fragmentleri içeren suicide vektörünü taşıyan bakteri kültürleri -80°C de dondurularak korunacaktır.

1.5. Bakteriyal konjugasyon:

Rekombinant suicide vektörler önce verici suş *E. coli* SM10λpir'e elektroporasyonla daha sonrada ekibimizin başarı ile kullandığı konjugasyon yöntemiyle (Karsi ve Lawrence, 2007) wild tip *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum*'a aktarılacaktır. Kısaca, 1 ml verici (*E. coli* SM10λpir) ve 1 ml alıcı bakteriler (*Y. ruckeri* ve *L. anguillarum*) ayrı ayrı santrifüjle pelet haline getirilecek, peletlerden colistin ve Cm antibiyotiklerini uzaklaştırmak için peletler 3 defa antibiyotik içermeyen BHI sıvı ortamı ile yıkanacak, peletler 1:2 (Verici:Alıcı) karıştırılacak ve antibiyotik içermeyen BHI katı besiyerine yerleştirilmiş 0,45 µM filtre kağıdı üzerine aktarılacaktır. 25°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra filtre kağıdındaki bakteriler içerisinde colistin ve Cm bulunan BHI ile yıkandıktan sonra yine içerisinde aynı antibiyotikler bulunan katı BHI'ya yayılacaktır. Aynı şekilde 25°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra, Cm dirençli plazmitleri içeren *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* kolonileri seçilecektir. Bu bakteriler daha sonra sukroz içeren besiyerinde büyütülerek çift homolog rekombinasyona uğrayan bakteriler elde edilecektir. Suicide plazmidin üzerinde bulunan *sacB* geni sukroz bulunan besiyerinde bakterilerin büyümesini engellemektedir.

1.6. *aroA* ve *aroC* mutant bakterilerin fenotipik olarak belirlenmesi:

Potansiyel *aroC* mutant *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* ve wild tip *Y. ruckeri* RB0708 ve *L. anguillarum* LMG10861 ayrı ayrı 3 paralel halinde içerisinde hiç bir aromatik amino asit içermeyen LB'ye ekim yapılacaktır. Aynı zamanda mutan aynı bakteriler içerisinde tirozin (40 µg /ml), triptofan (40 µg/ml), fenilalanin (40 µg /ml), ve p-aminobenzoik asit (dihydroxybenzoic asit; 10 µg /ml) bulunduran M9 besiyerinde ekimi yapılacak ve 25°C de 48 saat inkübe edileceklerdir. (Hernanz Moral vd., 1998).

1.7. *aroA* ve *aroC* mutant bakterilerin genotipik olarak belirlenmesi:

Wild-tip *Y. ruckeri* RB0708 ve *L. anguillarum* LMG10861 ile bunların *aroC* mutant suşu içerisinde tirozin, triptofan, fenilalanin, ve p-aminobenzoik asit bulunduran M9 besiyerinde 25°C de 48 saat inkübe edilecektir (Hernanz Moral vd., 1998). Mutantasyona uğratılan bakterilerin gerçekten mutasyona uğrayıp uğramadıkları, mutan bakterilerin mutasyona uğratılan genleri PZR ile çoğaltıldıktan sonra hem büyüklüklerine hem de sekanslarına bakılarak belirlenecektir (Altınok vd., 2007; Altınok vd., 2008).

1.8. *aroA* ve *aroC* mutant bakterilerin istikrarlılığı ya da geriye dönüşüm olasılığının belirlenmesi:

Aşıl olarak kullanılacak ve delesyonla *aroA* ve *aroC* mutant yapılan bakterilerin istikrarlılığının ne kadar devam ettiğini belirlemek için *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* 30 defa içerisinde tirozin, triptofan, fenilalanin, ve p-aminobenzoik asit bulunan BHI broth da pasajı yapılacaktır (Thune ve Cooper, 2000). Kısaca açıklamak gerekirse, 24 saat inkübe edilmiş bakterilerin bulunduğu tüpten 50 µl alınarak yeni 2 ml'lik BHI broth tüpüne aktarılacaktır. Bu işlem üç replika halinde yapılacaktır. Her beş pasaj sonunda her bir replikadan 500 µl alınarak 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılacak, 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilecek, üst kısımda bulunan sıvı kısım atıldıktan sonra peletlere 500 µl steril distile su eklenerek peletlerin suya geçmesi için kısa süreli vorteksleneyecektir. Bakteriler 10 dakika kaynatıldıktan sonra tekrar 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilecek ve üst sıvı kısım PZR'de kullanılacaktır. Yukarıda açıklanan mutant bakterilerin elde edilmesi başlığı altında elde edilecek primerler ve PZR şartları kullanılarak *aroC* geninin amplifikasyonu yapılacaktır. Elde edilen ürünler %1'lik agarozda yürütüldükten sonra görüntülenecektir. *aroA* ve *aroC* mutant bakterilerde bu gen bölgesi olmayacağından wild-tiple kıyaslandığında daha kısa PZR ürünü oluşacaktır. Eğer bakteriler *aroA* ve *aroC* mutant yapıldıkları wild-tiplerine geri dönerlerse beklenen bant büyüklüğü her iki bakteri için yaklaşık 1100 baz çifti olacaktır. *aroA* ve *aroC* mutant bakteriler pasajlar sonunda ebeveynleri olan *Y. ruckeri* RB0708 ve *L. anguillarum* LMG10861 suşlarına geri dönerlerse aşağıda belirtilen B planına geçilerek diğer *aro* genlerinin mutasyonu yapılacaktır.

1.9. Mutant aşının stoklanması:

1.9.1. Uzun süreli stoklama:

Hazırlanan *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* içerisinde tirozin, triptofan, fenilalanin, ve p-aminobenzoik asit bulunan BHI ve marine broth'a inoküle edilecek, ve 22°C'de 80 rpm'de ki çalkalamalı inkübatörde 24 saat çoğaltılan bakteriler, 5 ml'lik karyo tüplere aktarılacak, üzerine final konsantrasyonu %20 gliserol olacak şekilde gliserol eklenecek ve -80°C'de stoklanacaktır.

1.9.2. Balıkları aşılama için kullanılacak mutant bakterilerin kısa süreli stoklanması:

Yukarıda stoklanan *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* içerisinde tirozin, triptofan, fenilalanin, ve p-aminobenzoik bulunan BHI ve marine broth'a inoküle edilecek, ve 22°C'de 80 rpm'de çalışan çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübe edilecektir. İnkübasyon sonunda bakteriler ayrı ayrı 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilecek, peletler PBS (8 g NaCl, 1.21 g K₂HPO₄, 0.34 g KH₂PO₄, 1.000 ml deiyonize su içinde eritilip, otoklavda sterilize edilecektir) ile yıkanacaktır. Yıkanan peletler PBS'de istenilen yoğunlukta seyreltildikten sonra +4°C'de 1-2 hafta stoklanacaktır. Denemeler sırasında bakteri yoğunluğunun belirlenmesinde MacFarland standardı kullanılacaktır.

2. Mutant *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* bakterilerinin balıklar üzerindeki virülans ve efikasite özelliklerinin belirlenmesi:

Aşı denemelerinde kullanılacak balıklar Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Kuluçkahanesinde bakteriyel enfeksiyonlara karşı korumalı şartlarda yetiştirilecektir. Aşı deneyleri öncesi her türlü bulaşma ihtimaline karşı balıkların alınacağı tanktan rastgele 10 balık alınarak *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* etkenleriyle enfekte olup olmadığını belirlemek için (aşağıda 3.1'de açıklandığı şekilde) kanda antikor seviye tespiti yapılacaktır. Denemede antikor negatif örnekler kullanılacaktır.

2.1. *aroA* ve *aroC* mutant bakterilerin virülanslığının belirlenmesi:

Mutasyona uğratılmamış wild-tip *Y. ruckeri* RB0708 ve *L. anguillarum* LMG10861 ile bu bakterilerin mutasyona uğratılmış formları arasında virülanslık farkı oluşup oluşmadığı aşağıdaki şekilde belirlenecektir.

Yaklaşık 15 g ağırlığındaki alabalıklar 250 litrelik üç kapalı devre sistemine alınacak ve iki hafta burada tutularak laboratuvar şartlarına alışmaları sağlanacaktır. Adaptasyon süresince ve sonrasında vücut ağırlıklarının %3'ü kadar günde iki defa yemlenecek ve 12 saat ışık 12 saat karanlık fotoperiyot uygulanacaktır. Enjeksiyon yapmadan önce balıklar 50 mg/L MS222 ile bayıltılacaktır. Balıkların yüzde ellisini öldüren dozun (LD_{50}) bulunması için, balıklar 16 gruba ayrılacak ve akarsu sistemine sahip her bir akvaryuma (40L) 10'ar balık stoklanacaktır. Bu amaçla, wild tip *Y. ruckeri* RB0708 BHI'a ve *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* de içerisinde tirozin, triptofan, fenilalanin, ve p-aminobenzoik asit bulunan BHI'a inoküle edilecek, 22°C'de ki 80 rpm'de çalışan çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübe edilecektir. İnkübasyon sonunda bakteriler ayrı ayrı 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilecek, peletler fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile yıkanacaktır. *Y. ruckeri* RB0708 ile aşı olarak kullanılacak *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* PBS ile 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 CFU oranında ayrı ayrı seyreltildikten sonra balıklara intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon yöntemiyle 100 µl solüsyon enjekte edilecektir. Diğer bir grup olan 10 kontrol balığa ise sadece 100 µl PBS enjekte edilecektir (Lan vd., 2007). Kolonilerin belirlenmesinde MacFarland standardı kullanılacaktır. Enfeksiyondan sonra balıklar 21 gün süreyle her gün gözlemlenecek ve ölmüş balıklar akvaryumlardan hemen alınarak bakteriyolojik yönden incelenecektir (Kayış vd., 2009). Deney süresince suyun sıcaklığı 16-18°C civarında tutulacak ve suyun pH, amonyum, NO_2 ve sıcaklık değerleri günlük olarak ölçülecektir. Balıklar vücut ağırlığının %3'ü kadar yemle günde iki defa yemlenecektir. Bu işlem 3 paralel halinde yapılacaktır. LD_{50} değeri de Reed ve Muench (1938)'e göre belirlenecektir.

Bu işlemlerin aynısı *L. anguillarum* için tekrarlanacaktır. Bu bağlamda balıklar bir ay süreyle Karadeniz'in suyuna adapte edildikten sonra denemelere başlanacaktır. *L. anguillarum* çoğaltılması için ise için marine broth (MB) ve marine agar (MA) kullanılacaktır.

2.2. *aroA* ve *aroC* mutant bakterilerin persistansının belirlenmesi

Persistansın belirlenmesi için ise 60 balığın her birine yukarıda belirlenecek LD_{50} değeri kadar CFU/balık *Y. ruckeri* RB0708 olacak şekilde 100 µl PBS solüsyonu IP olarak enjekte edilecektir. Aynı işlem *aroA* ve *aroC* mutant bakteri için tekrarlanacak olup kontrol grubundaki balıklara sadece 100 µl PBS enjekte edilecektir. 24 saat aralıklarla her bir gruptan 3'er balık yüksek dozda (150 mg/L) MS222 ile bayıltıldıktan sonra balığın kuyruk yüzgecinden kan aseptik olarak alınacak ve sonra karaciğer, dalak, böbrek ve ince bağırsaktan alınan örneklerle beraber aseptik olarak içerisinde colistin bulunan TSA'ya ekilecek 22°C de 48 saat inkübasyona tabi tutulacaktır (Lan vd., 2007). Böylece *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* ile wild tip *Y. ruckeri* RB0708'nin balıkların hangi organlarında ne kadar süreyle kaldıkları tespit edilecektir.

Bu işlemlerin aynısı *L. anguillarum* için tekrarlanacaktır. Bu bağlamda balıklar bir ay süreyle Karadeniz'in suyuna adapte edildikten sonra denemelere başlanacaktır. *L. anguillarum* çoğaltılması için ise MB ve MA kullanılacaktır.

2.3. Aşılama ve epruvasyon:

Denemelerde kullanılan balıkların ağırlıkları yaklaşık olarak 10-15 g olacaktır. Her bir denemeden önce balıklar laboratuvar şartlarına adapte edilecektir. Her bir gruptaki aşılama ve kontrol balıkları için farklı akvaryumlar kullanılacak olup aşılama ve epruvasyon işlemleri paralel yapılacaktır. Epruvasyondan sonra balıklarda görülebilecek ölümler 30 gün süreyle gözlemlenerek ölen balıklar rutin olarak bakteriyolojik yönden kontrol edilecektir. Ayrıca her türlü aşılama ve epruvasyon işlemlerinden önce balıklar 50 mg/L MS222 ile bayıltılacaktır.

2.4. Optimum aşı dozunun belirlenmesi:

Balıklar kırkaraklı altı gruba ayrılarak her bir grupta 4 akvaryum kullanılacak ve her bir akvaryuma da 10-15 g ağırlığında 15 balık stoklanacaktır. Gruplardan birisi pozitif kontrol ve diğeri de negatif kontrol olarak kullanılacağından, pozitif gruptaki balıklara sadece 100 µl PBS enjekte edilecekken negatif gruptaki balıklara hiçbir müdahale edilmeyecektir. Enjeksiyon işleminin nasıl yapılacağı yukarıda açıklandığı şekliyle yapılacaktır. Diğer dört gruptaki balıklar ise yukarıda *aroA* ve *aroC* mutant bakteriler için belirlenecek LD_{50} değerinden daha düşük dört farklı dozda *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* ip olarak verilecektir. Deneyler akarsu sistemine sahip akvaryumlarda yapılacak olup, 30 günlük deney süresince suyun sıcaklığı 16-18°C civarında tutulacak ve suyun pH, amonyum, NO_2 ve sıcaklık değerleri günlük olarak ölçülecektir. Balıklar vücut ağırlığının %3'ü kadar yemle günde iki defa yemlenecektir. Otuz günün sonunda balıklara yukarıda bulunacak LD_{50} değerinin 30 katı fazla *Y. ruckeri* RB0708 100 µl PBS içerisinde i.p. yöntemiyle verilecektir. Balıklar 30 gün süreyle gözlemlenerek ölen balıklar kaydedilecektir. Deney süresince ölen balıklar rutin olarak bakteriyolojik yönden kontrol edilecektir.

Bu işlemlerin aynısı *L. anguillarum*' için deniz suyunda tekrarlanacaktır.

2.5. Aşının etkinliğinin belirlenmesi:

Elde edilen *aroA* ve *aroC* mutant *L. anguillarum* ve *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri*'nin alabalıklarda vibriosis ve yersiniyöz hastalıklarına karşı koruma sağlayıp sağlamadığını belirlemek için laboratuvar şartlarına adapte edilmiş 10-15 g ağırlığındaki balıklar *aroA* ve *aroC* mutant *L. anguillarum* ve *Y. ruckeri* ile enfekte edilecektir. Bu amaçla *aroA* ve *aroC* mutant bakteriler yukarıda açıklandığı gibi çoğaltılacak, santrifüj edilecek, PBS ile yıkanacak ve uygun dozda PBS ile seyreltilenecektir. Balıklar kırkaraklı altı gruba ayrılarak her bir grupta dört akvaryum kullanılacak ve her bir akvaryuma da 10 balık stoklanacaktır. Gruplardan birisi negatif kontrol bir diğeri de pozitif kontrol olarak kullanılacağından, negatif gruptaki balıklara hiçbir müdahale

edilmeyecekken, pozitif gruptaki balıklara sadece 100 µl PBS ip olarak enjekte edilecektir. Diğer dört gruptaki balıklara ise yukarıda belirlenen optimum dozda *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* ip olarak verilecektir. Enjeksiyon işleminin nasıl yapılacağı yukarıda açıklandığı şekilde yapılacaktır.

Deneyler akarsu sistemine sahip akvaryumlarda yapılacak olup, deneme 30 gün sürecektir. Otuz günün sonunda negatif kontrol haricindeki diğer gruplardaki balıklara 10^6 CFU/balık *Y. ruckeri* RB0708 ip olarak verilecektir. Bu işlem 3, 6, 9, 12 ay sonrasında tekrarlanarak ölen balıklar kaydedilecek ve ölümler olduğunda balıklardan triptik soy agar (TSA) ve marine agara ekim yapılacak ve ölüm sebebi araştırılacaktır. Böylece elde edilecek mutant aşılardan ne kadar süreyle koruma sağladığı da tespit edilebilecektir. 1, 3, 6, 9, 12 ay sonunda aşılardan sağladığı göreceli korunma oranı (RPS) aşağıdaki formül ile hesaplanacaktır.

$$RPS = [1 - (\text{Aşılı balıklardaki mortalite (\%)} / \text{Kontrol grubundaki mortalite (\%)})] \times 100$$

Bu deney de kapalı ortamda bulunan akarsu sistemiyle çalışan akvaryumlarda yapılacaktır. Deney süresince suyun sıcaklığı 16-18°C civarında tutulacak ve suyun pH, amonyum, NO₂ ve sıcaklık değerleri günlük olarak ölçülecektir. Balıklar vücut ağırlığının %3'ü kadar yemle günde iki defa yemlenecektir.

Bu işlemlerin aynısı *L. anguillarum* için tekrarlanacaktır. Bu bağlamda balıklar bir ay süreyle Karadeniz'in suyuna adapte edildikten sonra denemelere başlanacaktır.

2.6. Banyo (immersiyon) yöntemiyle aşılama:

İmmersiyon yönteminde fazla miktarda bakteri kullanılacağından biyogüvenlik açısından ilk denemelerde immersiyon yöntemi kullanılmayacaktır. Mutant bakterilerin güvenli olduğu belirlendikten sonra, saha denemelerinden hemen önce yukarıdaki yöntem kullanılarak enjeksiyon yöntemi yerine immersiyon yöntemi denenecektir.

2.6.1. İmmersiyon yönteminde uygun dozun bulunması

Bu denemelerde 4-5 g'lık balıklar kullanılacaktır. Balıklar ortama adapte edildikten sonra *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* ile aşılanacaktır. Bu amaçla balıklar kırkarlı altı gruba ayrılarak her bir grupta üç akvaryum (40 L) kullanılacak ve her bir akvaryuma da 10 balık stoklanacaktır. Gruplardan birisi negatif kontrol bir diğeri de pozitif kontrol olarak kullanılacağından, negatif gruptaki balıklara hiçbir müdahale edilmeyecekken, pozitif gruptaki balıklara sadece PBS eklenecektir. Diğer dört gruptaki balıklar ise dört farklı konsantrasyonda (1×10^2 CFU/ml, 1×10^4 CFU/ml, 1×10^6 CFU/ml ve 1×10^8 CFU/ml) *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* ile banyo yaptırılacaktır. Deneyler akarsu sistemine sahip akvaryumlarda yapılacaktır. Deneme sırasında akvaryumlara gelen sular kapatılacak, ve su seviyesi de 15 L'ye düşürüldükten sonra akvaryumlara *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* istenilen konsantrasyonda eklenecektir (Altınok vd., 2007). 30 günlük deney süresince suyun sıcaklığı 16-18°C civarında tutulacak ve suyun pH, amonyum, NO₂ ve sıcaklık değerleri günlük olarak ölçülecektir. Balıklar vücut ağırlığının %3 kadar yemle günde iki defa yemlenecektir. Otuz gününün sonunda balıklar 1×10^8 CFU/ml *Y. ruckeri* RB0708 ile yukarıda açıklandığı gibi banyo yaptırılacaktır. Balıklar 30 gün süreyle gözlemlenerek ölen balıklar kaydedilecektir. Böylece elde edilecek sonuçlardan farklı yoğunluktaki mutant *Y. ruckeri*'nin hangi konsantrasyonunun ne kadar koruma sağladığı göreceli korunma oranı ile hesaplanacaktır. Negatif kontrol grubu hiçbir şekilde ne aşılanacak nede wild tip bakteri ile enfekte edilecektir. Negatif grubu kullanmanın amacı deneme süresince olabilecek beklenmedik ölüm yada anormallikleri belirlemektir.

Bu işlemlerin aynısı *L. anguillarum*' için deniz suyunda tekrarlanacaktır.

2.7. Karma aşı denemeleri:

Aşı olarak kullanılacak *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* ile *aroA* ve *aroC* mutant *L. anguillarum*'un optimum dozları kullanılarak her ikisi birbirine karıştırılacak ve aşı olarak tekrar denenecektir. Bu bağlamda *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* içerisinde tirozin, triptofan, fenilalanin, ve p-aminobenzoik asit bulunan BHI'a inoküle edilirken *aroA* ve *aroC* mutant *L. anguillarum* da içerisinde aynı miktarda tirozin, triptofan, fenilalanin, ve p-aminobenzoik asit bulunan MB'a inoküle edilecek, 22°C'de 80 rpm'de çalışan çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübe edilecektir. İnkübasyon sonunda bakteriler ayrı ayrı 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilecek, peletler PBS ile yıkanacaktır. *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* ile *aroA* ve *aroC* mutant *L. anguillarum*'un konsantrasyonları optimum dozu (CFU/ml PBS) 2 katı olacak şekilde PBS ile seyreltilecek ve sonrada ikisi birebir oranında karıştırılarak +4°C de saklanacaktır.

Karma aşı yukarıda yapılan denemelerde elde edilen en iyi aşılama metoduna (immersiyon veya ip) göre denenecektir.

Laboratuvar şartlarında elde edilen en uygun aşı konsantrasyonu en uygun yöntemle sahada balık çiftliklerinde denenecektir. Saha çalışması için Tarım Bakanlığı'nın ilgili biriminden gerekli izin alınmıştır (Bakınız ek yasal izin belgesi).

Saha denemelerinde kullanılacak balıkların daha önce *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* etkenleriyle enfekte olup olmadığını belirlemek için (aşağıda 3.1'de açıklandığı şekilde) her bir gruptan 15 balık alınarak kanda antikor seviye tespiti yapılacaktır. Denemede antikor negatif örnekler kullanılacaktır. Deniz ve tatlı suda yapılacak saha denemelerinde 50 ile 100 g arasında yaklaşık 5000 balık aşılanacaktır. Saha denemelerinde negatif kontrol grubu da kullanılacaktır.

Yersinia ruckeri ile yapılacak saha denemeleri tatlı ve deniz suyunda ve *L. anguillarum* ise deniz suyunda yapılacaktır. Deniz suyu ile yapılacak denemeler Trabzon, Yomra ilçesi açıklarındaki kafesler kullanılacaktır. Balıklar aşılandıktan bir ay sonra antikor seviyeleri ölçülerek yeterli antikor seviyesine sahip (bu oran laboratuvar denemelerinde tespit edilen oran olacaktır) olanlar denizdeki kafeslere nakledilecektir. Aşılamadan sonraki 3. ve 6. aylarda balıklarda saha şartlarında antikor seviyesinde oluşan değişimler belirlenecektir.

2.8. İstatistik analiz:

Aşılamadan, serum antikor testinden ve gen ekspresyonundan elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilecektir. Aşılanan ve aşılanmayan grup arasındaki istatistiki farklılıklar chi-square testi ve one-way ANOVA kullanılarak yapılacaktır.

3. *aroA* ve *aroC* mutant aşılarda balıkların bağışıklık sistemi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi:

Elde edilen *aroA* ve *aroC* mutant *L. anguillarum* ve *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri*'nin alabalıkların bağışıklık sistemi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için laboratuvar şartlarına adapte edilmiş 25 g ağırlığındaki balıklar *aroA* ve *aroC* mutant *L. anguillarum* ve *Y. ruckeri* ile enfekte edilecektir. Bu amaçla *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* yukarıda açıklandığı gibi çoğaltılacak, santrifüj edilecek, PBS ile yıkanacak ve uygun dozda PBS ile seyreltilenecektir. Balıklar altmışarlı dört gruba ayrılarak her bir grupta altı akvaryum kullanılacak ve her bir akvaryuma da 10 balık stoklanacaktır. Gruplardan birisi negatif kontrol bir diğeri de pozitif kontrol olarak kullanılacağından, negatif gruptaki balıklara hiçbir müdahale edilmeyecekken, pozitif gruptaki balıklara sadece 100 µl PBS ip olarak enjekte edilecektir. Diğer gruptaki balıklara ise yukarıda belirlenen optimum dozda *aroA* ve *aroC* mutant *Y. ruckeri* ip olarak verilecektir. Enjeksiyon işleminin nasıl yapılacağı yukarıda açıklandığı şekilde yapılacaktır.

Bu deney de kapalı ortamda bulunan akarsu sistemiyle çalışan akvaryumlarda yapılacak olup, deneme 180 gün sürecek. Deney süresince suyun sıcaklığı 16-18°C civarında tutulacak ve suyun pH, amonyum, NO₂ ve sıcaklık değerleri günlük olarak ölçülecektir. Balıklar vücut ağırlığının %3'ü kadar yemle günde iki defa yemlenecektir.

Bu işlemlerin aynısı *L. anguillarum* için tekrarlanacaktır. Bu bağlamda balıklar bir ay süreyle Karadeniz'in suyuna adapte edildikten sonra denemelere başlanacaktır.

Bu deneyin 3 aylık tekrarı karma aşı için kullanılacaktır.

Bu denemedeki balıklar humoral bağışıklığın ve bağışıklık sistemi gelişiminin gen ekspresyonu ile belirlenmesinde kullanılacaktır.

3.1. Humoral bağışıklığın ELİSA yöntemiyle belirlenmesi:

Aşılama sonrası alabalıklarda oluşan antikor titresi Lunda ve ark. (2006) tarafından tarif edilen ELİSA yöntemiyle belirlenecektir. Aşılama sonrası balıkların kan serumunda *Yersinia ruckeri*'ye karşı oluşan antikor seviyeleri aşılama sonrası 1., 3. ve 6. ayda oluşan antikor miktarı modifiye edilmiş ELİSA ile belirlenecektir (Magnadottir vd., 1998). Denemeye başladıktan 1, 3 ve 6 sonra her bir gruptan 5 balık 150 mg/L MS222 ile bayıltıldıktan sonra kuyruk kısmı kesilerek kanları ayrı ayrı heparinli tüplerde toplanacak ve 4000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek serum kısmı başka bir tüpe aktarılacaktır. Plazma hemen çalışılacaksa +4°C'de stoklanacak aksi halde -20°C'de saklanacaktır.

Kısaca, 96 kuyucuklu mikrotiter platelerin iç yüzeyi 50mM karbonat tamponda (pH 9.6) 5µg/ml poli L-lizin (PLL, Sigma) ile 4°C'de bir gece kaplanacaktır. Ayrıca, serum fizyolojikte daha önceden hazırlanmış (OD₆₀₀ nm~0,4) inaktive *Yersinia ruckeri* hücreleri her bir kuyucuya 100 µl ilave edilecek, platerler santrifüj edilecek ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilecek. Daha sonra, plaklara % 5 yağsız sütozu ile hazırlanmış PBS (pH 7.3) ilave edilerek 4°C'de bir gece inkübe edilecek ve kullanılabilecek kadar -20°C'de derin dondurucuda stoklanacak. Alabalık serumu başlangıçta 1:50 oranında %5 yağsız sütozu ile hazırlanmış PBS ile sulandırıldıktan sonra iki kat dilisyonlar yapılarak her bir kuyucuğa 100µl ilave edilecek. Bağlı antikorlar polyclonal tavşan-anti-alabalık immmonoglobulin (Ig) anti serumuyla beraber oda sıcaklığında 2 saat inkübasyondan sonra belirlenecek, bu olayı takiben, % 5lik yağsız sütozu içeren PBS de alkalın fosfatazla (Sigma) konjüge edilen goat-anti tavşan Ig ilave edilecek. Son olarak, 1 mm MgCl₂ içeren pH 9.6 ayarlanmış etanolamin buferde (1 mg/ml) p-nitrofenil fosfat substratı eklendikten 45 dakika sonra renk değişimi OD₄₀₅ nm'de okunacaktır. Plaka, inkübasyonlar arasında %0.05 Tween 20 içeren PBS ile 3 kez yıkanacak.

Bu işlemlerin aynısı *L. anguillarum* için tekrarlanacaktır.

3.2. Bağışıklık sistemi gelişiminin gen ekspresyonu ile belirlenmesi:

Mutan bakterilerle enfekte olmuş 5 balıkla, 5 enfekte olmamış kontrol balık, 0. saat ile 8. saat, 1., 3., 7., 14. ve 30. gün sonrası aynı anda 150 mg/l MS-222 ile bayıltılacak, karaciğer steril olarak alınacak ve -80°C'de RNA izolasyonu yapılabilecek kadar bekletilecektir. Olası hasta balıklar bu denemede kullanılmayacaktır.

3.2.1. Toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi:

Sonikatör yardımıyla karaciğer buzda homojenize edilecek ve toplam RNA, RNA kiti ile üretici firmanın tavsiyesine göre ekstrakt edilecektir. Genomik DNA ise Deoksiribonükleaz-I enzimi ile elemine edildikten sonra RNA konsantrasyonu spektrofotometrede ölçülecektir. Üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda cDNA sentezi 400 ng toplam RNA ve 20µL reverse transkripsiton reagent'ı kullanılarak yapılacaktır. Rastgele hexamer primerleri reverse transkripsiyon reaksiyonunda kullanılacaktır. Sentezlenen cDNA 1:10 oranında seyreltildikten sonra -20°C'de saklanacaktır.

3.2.2. Gen ekspresyonu:

Sitokinlerden IL-6, bazı akut faz proteinleri (SAA), komplement faktörler (C3, C5 ve faktör B)'yi kodlayan genlerin ekspresyonu kantitatif real time PZR (qPZR) kullanılarak yapılacaktır (Raida ve Buchmann, 2009). Genlerin GenBank'daki sekanslarına göre primerler ve çift yönlü işaretlenmiş TaqMan1 problemleri, 5' HEX, FAM ya da CY 5 ve 3' BHQ1 yada BHQ2 edilip birleştirilecektir (Raida ve Buchmann, 2009). Primerler ve problemlerin listesi tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1.

Gene	GenBank accession no	Forward primer	Reverse primer	Probe
IL-6	DQ866150	ACTCCCCTCTGTACACACC	GGCAGACAGGTCTCCACTA	CCACTGTGCTGATAGGGCTGG
SAA	X99387	GGGAGATGATTACAGGGTTCCA	TTACGTCCCCAGTGGTTAGC	TCGAGGACACGAGGACTCAGCA
C3	AF271080	ATTGGCCTGTCCAAACACA	AGCTTCAGATCAAGGAAGAAGTTC	TGGAATCTGTGTGTCTGAACCCC
C5	AF349001	TGGCAAGGACTTTTCTGCT	AGCACAGGTATCCAGGGTTG	CTGGCAGGGATTGCATCAAATC



Factor B	AB044939	AGAGACTGGCAGCGTTTGT	AGAGCAGCGTACAGGTTGGT	CACCGAAGCCACGGAACAA
House-keeping gene EF-1α	AF498320	ACCCCTCCTCTTGGTCGTTTC	TGATGACACCAACAGCAACA	GCTGTGCGTGACATGAGGCA

3.2.3. *qPZR kondisyonu ve döngüsü*: qPZR reaksiyonunda 6,25 µL Taq ready karışım, 3–6 mM MgCl₂, 0.5 µL forward ve reverse primer (10 mM), 0.5 µL TaqMan1 probe (5 mM), 2.5 µL seyreltik cDNA (1:10) ve 12.5 µL su kullanılacaktır. Reaksiyon döngüsü ise, ilk 2 dakika 94°C'de denaturasyon, akabilinde 30 döngülük denaturasyon (94°C'de 30 saniye), tutunma ve uzama beraber (60°C de 1 dakika) gerçekleştirilecektir. Karaciğerde yaygın olarak bulunan EF1-a genine ait primerler ve prob iç kontrol olarak kullanılacaktır.

Bu işlemlerin aynısı *L. anguillarum* için tekrarlanacaktır.

Orman Çalışma Alanı Örneği :

A. Kullanılacak kağıt hamuru türü: Selüloz asetat üretiminde kullanılacak olan çözünabilir kağıt hamuru (bleached eucalyptus dissolving pulp) Celltech Madrid/Spain firmasından temin edilecektir. Bu firmadan ön çalışmaları yapmak için çözünabilir hamur temini yapılmıştır. Proje çalışmasının başlamasını takiben yeni temin işlemi yapılacaktır. Çalışmaya başlamadan önceden selüloz asetat üretiminde kullanılacak çözünabilir kağıt hamurlarına uygulanan standart testlerle birlikte özellikler ortaya konulacaktır. Bu testler;

- Alfa selüloz içeriği: Alfa selüloz içeriği belirli koşullar altında % 17,5'lik sodyum hidroksit çözeltisi içerisinde hamurun çözünmeden kalan miktarının ifade edilmesinde kullanılır. Bu değerlerin belirlenmesinde TAPPI T 203 cm-99 (2009) standardı kullanılacaktır. Alfa selüloz içeriği çözünür hamurun saflık oranının ifade edilmesinde kullanılan bir değerdir.
- Viskozite ve polimerleşme derecesinin tayini: Hamurun viskozite veya polimerleşme derecesinin tayini selülozun molekül uzunluğunun tayin edilmesi açısından önemli bilgiler taşır. Hamurun polimerleşme derecesi genellikle hamurun bazı çözücüler içerisinde hazırlanmış olan çözeltilerinin viskozitesinin belirlenmesiyle bulunmaktadır. Bu değerlerin belirlenmesi için SCAN-C 15:62 standardı kullanılacaktır. Selüloz asetatın belirli koşullar altında üretilmesi nedeniyle, hamurun polimerleşme derecesi elde edilen selüloz asetatın polimerleşme derecesi üzerine bazı etkileri bulunmaktadır.
- Kalıntı lignin miktarı: Hamur içerisinde kalan kalıntı lignin asetilasyon esnasında lignin-asetatların oluşumuna neden olur. Bu da üretilen ürünün özellikle çözücüler içerisinde çözünmesi üzerine olumsuz etki eder. Yani selüloz asetat çözeltileri hazırlanırken ve daha sonrasında film üretilirken bazı safsızlıkların film içerisinde kalmasına neden olur. Kalıntı lignin miktarının belirlenmesi için TAPPI T 220 om-06 yönteminin kullanılması planlanmaktadır.
- R₁₀, R₁₈, S₁₀ ve S₁₈ değerlerinin tespiti: R₁₀, R₁₈; S₁₀ ve S₁₈ değerleri belirli koşullar altında hamurun % 10 ve 18'lik sodyum hidroksit çözeltileri içerisindeki çözünürlüklerinin belirlenmesiyle elde edilir. Bu değerlerin belirlenmesi için TAPPI T 235 cm 00 (2009) standardı kullanılacaktır. S₁₀ ve S₁₈ değerleri hamurun % 10 ve 18'lik sodyum hidroksit çözeltisi içerisinde yüzde olarak çözünen miktarı, R₁₀, R₁₈ ise aynı çözeltiler içerisinde çözünmeden kalan miktarı yüzde olarak ifade etmekte kullanılır. Genellikle % 10'luk çözünürlük; hamur içerisinde bulunan düşük zincir uzunluğuna sahip selüloz miktarının, % 18'lik çözünürlük ise hamur içerisinde bulunan hemiselüloz miktarının ifade edilmesinde kullanılmaktadır.
- Kristal yapı analizi: Kompozit bir malzeme olan odundan elde edilen hamurun kaynağına bağlı olarak farklı kristalen yapıya sahip bölümleri vardır. Selülozun reaktifliği büyük ölçüde kristalen yapısı ile ilgilidir. Farklı kristalen yapısındaki bölgelerde meydana gelen reaksiyon miktarları farklı olacağından bu hamurun sahip olduğu ortalama kristalen ve amorf bölge oranlarının bilinmesi seçilecek reaksiyon parametrelerinin belirlenmesi açısından önemlidir. Hamurun sahip olduğu kristalen ve amorf bölge oranlarının belirlenmesinde X-ışını difraksiyon metodu kullanılacaktır. Taramalar 0°-40° arasında yapılacak olup; açısı adımları 0.05° olarak seçilecektir.

Kristallik derecesi Segal yöntemine göre (Gümüşkaya v.d. 2003);

$$CrI = 100 \frac{I_{002} - I_{Amorph}}{I_{002}}$$

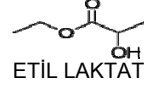
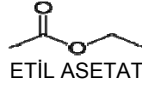
Kristalit boyutları ise Scherrer eşitliğine göre hesaplanacaktır.

$$D_{(hkl)} = \frac{k\lambda}{B_{(hkl)} \cos\theta}$$

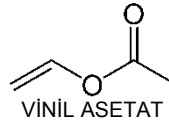
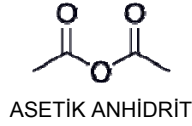
Yukardaki formüllerde I₍₀₀₂₎ ve I_(AMORPHOUS), kristalen ve amorf bölgelerde ölçülen x-ışını değerleridir. Kristalit boyutu eşitliğinde ise λ x-ışını dalga boyu, k Scherrer sabiti (0.84), B_(hkl) kristalen yansımada elde edilen pik genişliği ve θ kristal yansımanın elde edildiği açıdır (Gümüşkaya v.d. 2007).

B. Selüloz Asetat Üretimi: Selüloz asetat üretimi çözünabilir hamurun aktivasyonu, asetillendirilmesi, çöktürülmesi ve yıkanması şeklinde sıralanabilir.

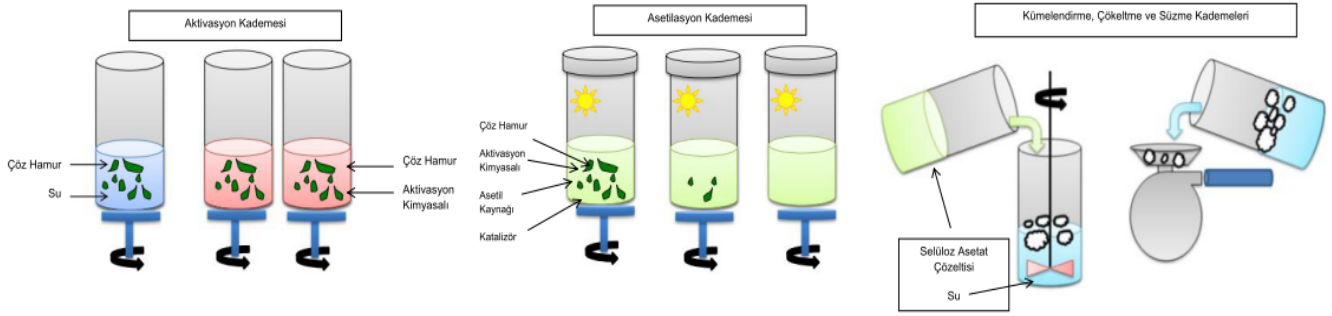
- Aktivasyon kademesi: Çalışma kapsamında çözünabilir kağıt hamurunun aktivasyonu için üç farklı kimyasal madde denenecektir. Bunlardan birincisi asetik asit olup kontrol denemesi amaçlı kullanılacaktır. Diğerleri etil asetat ve etil laktatdır. Bu iki kimyasal çeşitli çalışmalarda üretilen selüloz asetatın çözündürülmesinde kullanıldığı literatürde tespit edilmiştir. Ancak daha önceki çalışmalarda etil asetat ve etil laktatın aktivasyon amaçlı kullanılmadığı belirlenmiştir. Kullanım oranı 1 birim selüloz için 100 birim aktivasyon kimyasalı olarak planlanmaktadır.



- Asetil kaynakları: Çalışmalarda iki asetil kaynağının kullanıldığı görülmektedir. Aynı şekilde bu çalışmada da asetik anhidrit ve vinil asetat asetil kaynağı olarak kullanılacaktır. Asetil kaynaklarının kullanım oranları ise 1 birim selüloz için 7-10 birim olarak planlanmıştır.



- Katalizörler: Selüloz asetat üretimi sırasında aktivasyon kademesinde katalizör olarak sırasıyla H_2SO_4 , çinko klorür ($ZnCl_2$), potasyum asetat (CH_3COOK) ve potasyum karbonat (K_2CO_3), denenecektir. Bu katalizörlerin kullanım miktarları üretimde kullanılan selüloz miktarına göre tespit edilecek olup, genel itibarıyla kullanım oranları %5-20 arasında düşünülmektedir. Çalışmada kullanılacak olan K_2CO_3 ve CH_3COOK ülkemizde daha önceki çalışmalarda odun modifikasyonu amaçlı asetillendirmede kullanılmıştır (Çetin ve Özmen 2011; Çetin, v.d. 2011; Özmen, 2012).
- Reaksiyon sıcaklığı ve süreleri: Selüloz asetat üretimi sırasında aktivasyon ve asetillendirme reaksiyonları oda sıcaklığında ($20^\circ C$), $40^\circ C$, $60^\circ C$, $80^\circ C$ ve $100^\circ C$ larda denenecektir. Süre sıcaklığa bağlı olarak azaltılacaktır. Genelde reaksiyon süresi olarak 3 ile 72 saat arasında değiştirilecektir. Burada genel olarak optimal sıcaklık ve süre uygulamasının belirlenmesinde selülozun çözünme miktarları ve DS miktarları etkili olacaktır. Selüloz asetatın üretim kademeleri aşağıda şekilde özetlenmiştir.

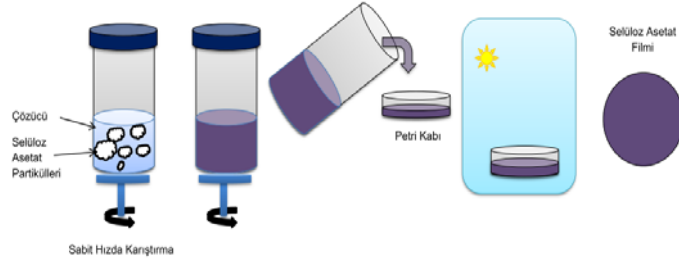


Selüloz asetatın özelliklerin belirlenmesi:

- Selüloz asetatın kristal yapı özellikleri: Bu özellikler çözünabilir hamurda kullanılan yöntemlerle birlikte tespit edilecektir. Hesaplamalarda kullanılacak olan veriler x-ışını diffraksiyonu yöntemiyle elde edilecektir. Buradan elde edilecek sonuçlar selüloz asetatın çözünürlüğü hakkında önemli bilgiler verecektir. Çözünür hamurun Kristal yapısının belirlenmesinde kullanılan yöntemler burada da kullanılacaktır.
- Serbest asit miktarının belirlenmesi: Klasik asetik asit yöntemiyle üretilen selüloz asetatın bünyesinde yıkamaya karşın belirli miktarda asit kalmaktadır. Kalan bu asit selüloz asit filmlerinin kullanım ömrünün azalmasına neden olmaktadır. Bunun nedeni serbest asit kalıntısının kullanım yerindeki nem ve sıcaklıkla birlikte hidroliz reaksiyonuna sebebiyet vermesidir. Ayrıca bu kalıntı asit plastikleştirici olarak kullanılan polimerleri olan reaksiyonları da etkilemektedir. Serbest asit miktarının belirlenmesi için ASTM D 871-96 (2010) standart yöntemi kullanılacaktır. Bu yöntemde selüloz asetatın tükettiği alkali miktarı tespit edilmektedir. Yöntemde indiktor olarak fenolfitaleyn kullanılırken, nötrleştirme için 0.01 N NaOH çözeltisi kullanılmaktadır.
- Sübstitüsyon derecesinin (DS) Tayini, Bağlı Asit veya Asetil Miktarının Tayini: Selüloz asetatın toplam sübstitüsyon derecesi ürünün davranış özellikleri üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Örneğin selüloz mono asetat suda çözünürken, triasetat ancak formik asit ve kloroform gibi çözücülerde çözünmektedir. Bu nedenle selüloz asetatın yapısında taşıdığı asetil ya da asetik asit miktarının bilinmesi gerekir. Çalışmada bu işlem için FT-IR spektroskopik yöntemi ile birlikte kimyasal titrasyon yöntemi (ASTM D 871-96,2010) kullanılacaktır. Heterojen sabunlaştırma yöntemi olarak adlandırılan bu yöntemde %75lik etil alkol içerisinde çözündürülen selüloz asetatın üzerine 0.5 N NaOH ilavesi yapılarak; fenolfitaleyn indikatörü eşliğinde 0.5N HCl ile titrasyonu gerçekleştirilir.
- Viskozite ve polimerleşme derecesinin (DP) tayini: Polimerleşme derecesinin tayini için ASTM D 871 -96 (2010) standardında yer alan iç viskozite yönteminden faydalanılacaktır. Daha sonra bulunan viskozite değeriyle DP hesaplanacaktır
- Kimyasal direnç özellikleri (çözünürlük): Üretilen selüloz asetatın farklı çözücüler karşısındaki çözünme davranışlarının incelenmesi düşünülmektedir. Bu çözücüler aseton, piridin, formik asit, dimetil formamid gibi çözücüler kullanılacaktır. Konsantrasyonun 0,01 g/mL olarak alınması planlanmaktadır.

C. Selüloz Asetat Filminin Üretimi: Selüloz asetat üretiminden sonra DS'ye bağlı olarak uygun çözücüler (etanol, aseton, piridin, DMF, dioksan gibi) tespit edilecektir. Çözünen selüloz asetat daha sonra petri kaplarının içerisine boşaltılarak vakumlu etüvlerde kurutulacaktır. Kurutma sıcaklığı kullanılan çözücüye uygun olarak tespit edilecektir. Daha sonra elde edilen filmlerin petri kapların ayrılmasını sağlamak için kısa

bir süre su içinde bekletilecektir. Daha sonra aşağıdaki özellikleri belirlenecektir. Çözünürlük işleminde konsantrasyon oranı genel olarak %2-5 arasında değiştirilecektir.



Selüloz asetat filmlerinin özelliklerinin belirlenmesi:

- Yüzey özelliklerinin belirlenmesi: Üretilen selüloz asetat filmlerinin yüzey özelliklerinin karakterize edilmesi, kullanım alanlarına uygunluk bakımından önemlidir. Bu amaçla selüloz asetat filmlerin SEM (Scanning Electron Microscopy) görüntüleri üzerinden yüzey özellikleri incelenecektir.
- Termal özelliklerin belirlenmesi: Selüloz asetat filmlerinin termal özelliklerinin belirlenmesi için DSC (Differential Scanning Calorimetry) ile belirlenecektir. Bu amaçla malzemenin kristalleşme (T_c), erime (T_m), bozunma (T_d) sıcaklıkları gibi bir takım özellikleri tespit edilecektir.
- Su buharı geçirgenliği: Selüloz asetat filmlerinin yapısal olarak en önemli özelliklerinden biri geçirgenlik özellikleridir. Geçirgenlik miktarlarının test edilmesi özellikle ambalaj malzemesi olarak kullanılabilmesi açısından önem arz etmektedir. Bu amaçla su buharı geçirgenliği ASTM E96M12 standart yöntemine göre belirlenecektir. Bu yöntem $CaCl_2$ tuzunun selüloz asetat filminden geçecek olan su buharını absorplaması ilkesine göre tasarlanmıştır. Tuzun su buharını absorplama miktarına göre geçirgenlik hesabı yapılacaktır.
- Kopma ve uzama değerlerinin belirlenmesi: Bu analizler filmlerin kopma ve uzam miktarlarının tespiti için yapılacaktır. Testler sırasında ASTM D882 standart yöntemi kullanılacaktır.
- UV absorbans miktarı: Filmlere uygulanacak bu test ASTM D 1746 standardına göre UV spektrometre ile 380-780 nm dalga boyları arasında gerçekleştirilecektir.

6. PROJE YÖNETİMİ, EKİP VE ARAŞTIRMA OLANAKLARI

6.1 PROJE YÖNETİMİ

6.1.1. YÖNETİM DÜZENİ (İş Paketleri (İP), Görev Dağılımı ve Süreleri)

Projede yer alacak başlıca iş paketleri, her bir iş paketinin kim/kimler tarafından ne kadarlık bir zaman diliminde gerçekleştirileceği hakkındaki bilgiler aşağıda yer alan **İş-Zaman Çizelgesi** doldurularak verilmelidir. Her bir iş paketinde görev alacak personelin niteliği (yürütücü, araştırmacı, danışman, bursiyer, yardımcı personel) belirtilmelidir. Gelişme ve sonuç raporu hazırlama aşamaları proje çalışmalarına paralel olarak yürütülmeli ve ayrı bir iş paketi olarak gösterilmemelidir.

Gıda Çalışma Alanı Örneği:

İP No	İP Adı/Tanımı	Kim(ler) Tarafından Yapılacağı	AYLAR																																										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36							
1.1.	Proje için gerekli olan makine teçhizat ve sarf maddelerinin alımının yapılması	Yürütücü Araştırmacı																																											
1.2.	Asmanın fenolojik dönemlerin izlenmesi, Yaprak ve Toprak Analizlerinin yapılması	Araştırmacı																																											
2.1.	Bağ bozumu ve üzümlerin toplanıp pilot işletmeye taşınması	Bursiyer																																											
2.2.	Üzümlerin ezilme ve preslenmesi, fermentasyon takibi ve şarap üretimi	Yürütücü Bursiyer																																											
3.1.	Ekstraksiyon yöntemlerin ön denemelerin gerçekleştirilmesi	Araştırmacı																																											
3.2.	GC-FID için Bornova Misketine özel standart çözeltiler ile aroma metodu oluşturulması	Bursiyer																																											
3.3.	Genel Bileşim ve renk analizlerinin yapılması	Yürütücü Bursiyer																																											
3.4.	Serbest ve bağlı aroma maddelerinin analizi	Araştırmacı																																											
3.5.	Organik asitler ve şeker analizlerinin yapılması	Bursiyer																																											



İŞ-ZAMAN ÇİZELGESİ

Veteriner Çalışma Alanı Örneği:

İş Paketi Ad/Tanım	AYLAR																																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
Yönetim																																					
Malzeme ve cihaz alımı																																					
Çözültilerin ve besiyerinin hazırlanması																																					
Primer dizaynı ve mutan bakterin elde edilmesi-																																					
aroA ve aroC geninin klonlanması ve E. coli'ye aktarılması																																					
Bakteriyal konjugasyon																																					
aroA ve aroC mutan bakterilerin fenotipik ve genotipik özelliklerinin belirlenmesi																																					
aroA ve aroC mutant bakterilerin istikrarlılığı yada geriye dönüşüm olasılığının belirlenmesi																																					
aroA ve aroC mutant bakterilerin virülanslığının belirlenmesi																																					
aroA ve aroC mutant bakterilerin persistansının belirlenmesi																																					
Aşılama ve eprüvasyon																																					
Optimum aşı dozunun belirlenmesi																																					
Aşının etkinliğinin belirlenmesi																																					
Deneme sırasında bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu																																					
Deney balıklarında antikor seviyesinin belirlenmesi																																					
Mutant aşıların balıkların bağışıklık sistemi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi																																					
İmmersiyon yöntemiyle aşılama denemeleri																																					
Aşının sahada denenmesi																																					

İŞ-ZAMAN ÇİZELGESİ

Tarım Çalışma Alanı Örneği:

İş Paketi Ad/Tanım	AYLAR																																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
Projede kullanılacak makine teçhizat kimyasallar ve sarf malzemesi vb.temini	x	x	x																																		
Bitkilerin doğal alandaki lokasyonlarının belirlenmesi ve habitatdaki çiçek yapıları ve habituslarının incelenmesi			x	x																																	
Toplanan soğanların boylandırılması ve dokü kültürü çalışmaları					x	x	X																														
İlkbahar gezilerin düzenlenerek soğanların toplanması								x	x																												
Tarla denemelerinin kurulması													x	x																							
Çiçeklenme ile ilgili morfolojik gözlemlerin yapılması															x	x											x	x									
Yaprak ile ilgili ölçümlerin yapılarak denemenin ilk yılının hasat edilmesi																					x	x	x														
Denemenin hasat edilerek verilerin değerlendirilmesi																																	x	x			
Toplanan soğanlarda yüzey sterilizasyonu, pul yaprakların kültüre alınması, <i>In vitro</i> hızlı çoğaltım çalışmaları					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x									
Olgunlaşmamış embriyoların <i>In vitro</i> da kültüre alınması										x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																	
Olgun tohumlarda in vitro çimlenme testleri													x	x	x	x																					
<i>In vitro</i> 'da elde edilen soğancıkların köklendirilmesi ve dış şartlara alıştırmak için farklı ön muamelelerin uygulanması																								x	x	x	x	x	x	x	x						
<i>In vitro</i> 'da elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi ve dış şartlara alıştırma çalışmaları																													x	x	x	x	x				
Tarla ve Laboratuvar analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve sonuç raporunun hazırlanması																																		x	x	x	



İŞ-ZAMAN ÇİZELGESİ

Orman Çalışma Alanı Örneği:

İş Paketi Ad/Tanım	AYLAR																																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
Mikorizal mantarların toplanması	X	X	X				X	X	X																												
Mantarların saf kültürde izolasyonu	X	X	X	X			X	X	X	X																											
Katı kültürde misel üretimi		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																							
Tohum toplanması									X	X																											
Harç materyallerinin hazırlanması ve sterilizasyonu											X	X																									
Tohum ekimi ve mikoriza aşılama													X																								
Fidan bakım çalışmaları													X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Fidanların gözlem ve ölçülmesi																																X	X	X			
Fidan köklerindeki mikorizal enfeksiyonların hesaplanması																																X	X	X			
Sonuçların değerlendirilmesi ve sonuç raporun hazırlanması																																			X	X	X

6.1.2. BAŞARI ÖLÇÜTLERİ VE RİSK YÖNETİMİ

Projenin tam anlamıyla başarıya ulaşmış sayılabilmesi için **İş-Zaman Çizelgesinde** yer alan her bir ana iş paketinin hedefi, başarı ölçütü (ne ölçüde gerçekleşmesi gerektiği) ve projenin başarısındaki önem derecesi aşağıdaki **Başarı Ölçütleri Tablosu**'nda belirtilmelidir.

BAŞARI ÖLÇÜTLERİ TABLOSU (*)

İP No	İş Paketi Hedefi	Başarı Ölçütü (%, sayı, ifade, vb.)	Projenin Başarısındaki Önemi (%)**
1.1.	Proje için gerekli olan makine teçhizat ve sarf maddelerinin alımının yapılması	%100	%5
1.2.	Asmanın fenolojik dönemlerin izlenmesi, Yaprak ve Toprak Analizlerinin yapılması	%80	%5
2.1.	Bağ bozumu ve üzümlerin toplanıp pilot işletmeye taşınması	%80	%5
2.2.	Üzümlerin ezilme ve preslenmesi, fermentasyon takibi ve şarap üretimi	%100	%20
3.1.	Ekstraksiyon yöntemlerin ön denemelerin gerçekleştirilmesi	%60	%5
3.2.	GC-FID için Bornova Misketine özel standart çözeltiler ile aroma metodu oluşturulması	%90	%5
3.3.	Genel Bileşim ve renk analizlerinin yapılması	%70	%5
3.4.	Serbest ve bağlı aroma maddelerinin analizi	%80	%5
3.5.	Organik asitler ve şeker analizlerinin yapılması	%80	%5
3.6.	Fenol bileşiklerinin analizinin yapılması	%80	%10
3.6.	GC-O analizlerinin, duyu analizlerinin	%80	%10
4.	İstatistiksel analizlerin yapılması. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi	%100	%10

(*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

(**) Sütun toplamı 100 olmalıdır.

Projenin başarısını olumsuz yönde etkileyebilecek riskler ve bu risklerle karşılaşıldığında projenin başarıyla yürütülmesini sağlamak için alınacak tedbirler (**B Planı**) ilgili iş paketleri belirtilerek ana hatlarıyla aşağıdaki **Risk Yönetimi Tablosu**'nda ifade edilmelidir.

RİSK YÖNETİMİ TABLOSU (*)

İP No	En Önemli Risk(ler)	B Planı
2.1.	Seçilen 3 farklı yörede bulunan bağlardan temel araştırma materyali olan Bornova misketi üzümlerinin sağlıklı bir şekilde elde edilememesi	Araştırma materyali üzümler projeye destek veren ve belirtilen yörelerde bağları bulunan Sevilen ve Kavaklıdere Şarap İşletmelerinden temin edilecektir.
1.2.	Toprak analizleri ile ilgili olarak Ege Üniversitesi Toprak Bölümünde cihazlarda bir sorun yaşanması	Analizler Çukurova Üniverstesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümünde gerçekleştirilebilir.
3.	Üzüm ve şaraplarda enstrümantal cihazlarla yapılacak olan aroma maddeleri ve aroma aktif bileşiklerin tanımlanması, miktarlarının belirlenmesi, fenol bileşiklerinin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi, şeker ve organik asitlerin dağılımının ve miktarlarının belirlenmesi analizlerinde	Analizler aynı cihazlara sahip Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Merkezi laboratuvarında gerçekleştirilecektir. Burada da herhangi bir sorun olması durumunda Ç.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde bulunan cihazlardan yararlanılabilir.



	laboratuvarımızda bulunan cihazlarda bir problem olması	
--	---	--

(*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

6.2. PROJE EKİBİ

6.2.1. PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN DİĞER PROJELERİ VE GÜNCEL YAYINLARI

Proje yürütücüsünün TÜBİTAK, üniversite ya da diğer kurum/kuruluşların desteği ile tamamlamış olduğu projeler ile şu sırada yürütmekte olduğu veya destek almak için başvurduğu projeler hakkında aşağıdaki tablolarda yer alan bilgiler verilmelidir. Proje değerlendirme süreci sırasında destek kararı çıkması ve/veya yeni bir başvuru daha yapılması durumunda derhal TÜBİTAK'a yazılı olarak bildirilmelidir.

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN TÜBİTAK DESTEKLİ PROJELERİ (*)

Proje No	Projedeki Görevi	Proje Adı	Başlama-Bitiş Tarihi	Destek Miktarı (TL)

(*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN DİĞER PROJELERİ (DPT, BAP, FP6-7 vb.) (*)

Proje No	Projedeki Görevi	Proje Adı	Başlama-Bitiş Tarihi	Destek Miktarı (TL)

(*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN SON 5 YILDA YAPTIĞI YAYINLAR (*)

Yazar(lar)	Makale Başlığı	Dergi	Cilt/Sayı/Sayfa	Tarih

(*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

6.2.2. PROJE EKİBİNİN ÖNERİLEN PROJE KONUSU İLE İLGİLİ PROJELERİ

Proje ekibinin (proje yürütücüsü, araştırmacı, danışman) TÜBİTAK'a, herhangi bir kamu kurum ve kuruluşuna veya Türkiye'nin taraf olduğu uluslararası anlaşmalara dayalı olarak sağlanan fonlara sunulmuş olup öneri durumunda olan, yürüyen veya sonuçlanmış benzer konudaki projeleri varsa bu projeler hakkındaki bilgiler ve önerilen projeden ne gibi farkları olduğu aşağıdaki tabloda belirtilmelidir.

PROJE EKİBİNİN ÖNERİLEN PROJE KONUSU İLE İLGİLİ PROJELERİ (*)

Adı ve Soyadı	Projedeki Görevi	Proje Adı	Başlama-Bitiş Tarihi	Önerilen Projeden Farkı

(*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

6.3. ARAŞTIRMA OLANAKLARI

Bu bölümde projenin yürütüleceği kurum/kuruluş(lar)da var olup da projede kullanılacak olan altyapı/ekipman (laboratuvar, araç, makine-teçhizat vb.) olanaklar aşağıdaki tabloda belirtilmelidir.

MEVCUT ARAŞTIRMA OLANAKLARI TABLOSU (*)

Mevcut Altyapı/Ekipman Türü, Modeli (Laboratuvar, Araç, Makine-Teçhizat vb.)	Mevcut Olduğu Kurum/Kuruluş	Projede Kullanım Amacı

(*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

7. YAYGIN ETKİ

7.1. PROJEDEN BEKLENEN YAYGIN ETKİ

Proje başarıyla gerçekleştirildiği takdirde projeden elde edilmesi öngörülen/beklenen yaygın etkilerin (bilimsel/akademik, ekonomik/ticari/sosyal, araştırmacı yetiştirilmesi ve yeni projeler oluşturulması) neler olabileceği diğer bir ifadeyle projeden ne gibi çıktı, sonuç ve etkilerin elde edileceği kısa ve net cümlelerle aşağıdaki tabloda belirtilmelidir.

PROJEDEN BEKLENEN YAYGIN ETKİ TABLOSU

Yaygın Etki Türleri	Projede Öngörülen/Beklenen Çıktı, Sonuç ve Etkiler
Bilimsel/Akademik (Makale, Bildiri, Kitap)	Gıda çalışma alanı örneği: Farklı LAB türleri veya tür içerisindeki farklı bakteriler karbonhidrat metabolizmasını başlangıç kültürün genetik kapasitesine göre farklı metabolitlere, farklı miktarlarda dönüştürebilmektedir. Farklı çevrelerden izole edilen izolatlar zaman içerisinde kazandıkları genetik özellikler (kromozom veya plazmit) ile metabolit dönüşümünde başlangıç kültürü olarak kullanılan suşlardan daha etkin bir metabolik aktiviteye sahip olabilmektedirler. Metabolit üretimleri incelenen doğal izolatlar (Str. thermophilus ve Lb. plantarum) endüstriye başlangıç kültürü olarak önerilebilecektir. Dolayısıyla bu çalışma ile yoğurt endüstrisine, genetik özellikleri ve aroma üretim kapasiteleri belirlenmiş aroma geliştirici suşlar kazandırılacaktır ve Üniversite sanayi işbirliğini gelecekte geliştirecektir. Bakterilerden izole edilecek plazmitler, klonlama ve ekspresyon kapasitelerine göre Lactococcus, Lactobacillus ve S. thermophilus türlerinde klonlama vektörleri olarak kullanılabilecektir. Ayrıca bu plazmitlerin dar konakçı aralığına sahip olabilmeye özellikleri ile aşı transferinde kullanılabilmeye potansiyelleri vardır. Plazmitler, Gıdalarda oluşturulacak modifikasyon için gıdaya özgü vektör olarak integrasyon özelliğinden faydalanma potansiyeline sahip olabilir. En önemli özellikleri olan fermente gıda üretiminde bazı

	metabolitleri kodlama özellikleri ile katkı sağlayabileceklerdir. Yapılacak projede, metabolik mühendislik teknolojisi ile <i>S. thermophilus</i>'taki dört adet genin (<i>adhB</i>, <i>als</i>, <i>pfl/pflA</i> ve <i>glyA</i>) over ekspresyon tekniği ile aromatik bileşenlerin daha fazla üretimi sağlanacaktır. Bunun ile gıda bileşenleri (diasetil, asetat vs.) moleküler yolla üretilebilecek, aynı zamanda bu bileşenler gıda katkı ve koruyucu maddesi olarak önerilebilecektir. Yapılacak çalışma metabolit üretim çalışmalarına temel teşkil edebilecek ve bu konuda yüksek lisans ve doktora öğrencileri yetiştirilmesine zemin hazırlayacaktır. Proje ile genç bilim insanlarına yeni moleküler tekniklerin kazandırılacak ve indeksli dergilerde yayınlanacak çıktıları oluşturacaktır.
Ekonomik/Ticari/Sosyal (Ürün, Prototip Ürün, Patent, Faydalı Model, Üretim İzni, Çeşit Tescili, Spin-off/Start- up Şirket, Görsel/İşitsel Arşiv, Envanter/Veri Tabanı/Belgeleme Üretimi, Telif Konu Olan Eser, medyada Yer Alma, Fuar, Proje Pazarı, Çalıştay, Eğitim vb. Bilimsel Etkinlik, Proje Sonuçlarını Kullanacak Kurum/Kuruluş, vb. diğer yaygın etkiler)	Gıda çalışma alanı örneği Diğer taraftan endüstride halen kullanılmakta olan suşların metabolit üretme sorunları izole edilmiş suşlardaki plazmitler aktararak ticari suşların aroma sentez özellikleri artırılmış olacaktır. Fermentasyonda kullanılan LAB'ın oluşturduğu metabolitler, fermente süt ürünlerinde ideal fermentasyonu oluşturmalarının yanında gıdaları küflere ve laktik olmayan gram pozitif bakterileri karşı korumaktadır. LAB doğal olarak sadece laktik asiti inhibasyon seviyesinde üretmektedir ancak diğer metabolitlerinde inhibasyon seviyesinde olması gıda güvenliği açısından da önemlidir. İzole edilecek ve genetik kapasitesi aromatik metabolitler yönünden istenilen özellikte olan suşlar ülke ekonomisine katkı sağlayacak ve fermentasyon endüstrinin sorununu giderebilecek potansiyeldedir. Su Ürünleri alanı örneği : Bu projeye, Türkiye'de bakteriyel balık hastalıkları arasında en çok kayıplara sebep olan etkenlerden <i>L. anguillarum</i> ve <i>Y. ruckeri</i>'ye karşı koruyucu atenüe canlı aşı geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Böylece bu hastalıklardan kaynaklanan balık kayıpları, ilaç kullanılması sonucu oluşan çevre kirliliği, balıklarda antibiyotik kalıntı sorunları, tedavi için kullanılan giderlerle birlikte tedavi etmek amacıyla kullanılacak işgücü azaltılmış olacağından ulusal ekonomiye önemli katkı sağlanacaktır. Proje konusu, alanındaki TOVAG tarım grubu tarafından belirlenen ülke öncelikleri arasındadır. Ayrıca bu proje dünya genelindeki tüm yersinioz ve vibriosiz hastalıklarına karşı kullanılabileceğinden balık üreticilerinin sorunlarına çözüm üretebilecek nitelikte ve evrensel olma özelliğine sahip olup sonuçların ticarileştirilme potansiyeli yüksektir. Çalışma sonunda elde edilecek mutan canlı aşı balık yetiştiricileri tarafından kolaylıkla uygulanabilecektir. Bu proje diğer önemli Gram-negatif bakteri hastalıklardan korunma projelerine bir örnek teşkil edecek ve protokoller başka hastalıklar içinde uygulanabilecektir.

	Bu proje Doğu Karadeniz Bölgesi'nin en büyük balık üreticilerinden olan Şeramet Alabalık AŞ işletmesiyle işbirliği halinde hazırlanmış olup aşı denemeleri bu işletmenin imkanları kullanılarak yapılacaktır.
Araştırmacı Yetiştirilmesi ve Yeni Proje(ler) Oluşturma (Yüksek Lisans/Doktora Tezi, Ulusal/Uluslararası Yeni Proje)	Gıda çalışma alanı örneği : Projede izole edilen, genetik tanımlamaları, içerikleri belirlenen suşlar, doğal suşlar ve proje kapsamında genetik modifikasyon ile oluşturulacak suşlar, numaralandırılacak ve laboratuvarımızdaki mikroorganizma kültür koleksiyonunda -80°C'de saklanacaktır. Suşlar bilimsel çalışma yapacak bilim insanlarının kullanımına genetik içerikleri ile birlikte sunulacaktır.

7.2. PROJE ÇIKTILARININ PAYLAŞIMI VE YAYILIMI

Proje faaliyetleri boyunca elde edilecek çıktıların ve ulaşılabilecek sonuçların ilgili paydaşlar ve potansiyel kullanıcılara ulaştırılması ve yayılmasına yönelik yapılacak toplantı, çalıştay, eğitim, web sitesi, vb. ne tür faaliyetler yapılacağı aşağıdaki tabloda belirtilmelidir.

PROJE ÇIKTILARININ PAYLAŞIMI VE YAYILIMI TABLOSU (*)

Faaliyet Türü (Toplantı, Çalıştay, Eğitim, Web sayfası vb.)	Paydaş / Potansiyel Kullanıcılar	Faaliyetin Zamanı ve Süresi

(*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

BAŞVURU FORMU EKLERİ

EK-1: KAYNAKLAR

EK-2: BÜTÇE VE GEREKÇESİ

(*) EK-1 ve EK-2 hariç toplam 20 sayfayı geçen proje önerileri değerlendirmeye alınmadan iade edilir.
(Sayfa kontrolü sistem tarafından yapılmayıp, proje yürütücüsünün sorumluluğundadır.)